

# **Nebenströme der Lebensmittelindustrie als Substrate zur Produktion natürlicher Aromastoffe durch Basidiomyceten**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaft

Dr. rer. nat.

des Fachbereichs Biologie und Chemie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

M. Sc. Andrea Katharina Bosse

aus Frankfurt a. M.

2013

Dekan: Prof. Dr. H. Zorn

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Zorn,  
Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie  
Justus-Liebig-Universität Gießen
2. Gutachter: Prof. Dr. P. Czermak  
Institut für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische Technologie  
Technische Hochschule Mittelhessen Gießen

# Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind eingehalten.

---

Datum, Ort

---

Unterschrift

# Danksagung

---

Es ist nicht genug zu wissen - man muss auch anwenden.

Es ist nicht genug zu wollen - man muss auch tun...

Johann Wolfgang von Goethe

---

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2009 bis März 2013 am Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie der Justus-Liebig-Universität Gießen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Holger Zorn angefertigt.

Bedanken möchte ich mich besonders bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Zorn für die Bereitstellung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit, den gewährten Freiraum und die hervorragenden Arbeitsbedingungen sowie seinen ansteckenden Optimismus. Herrn Prof. Dr. Peter Czermak danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens. Herrn Prof. Dr. Siegfried Schindler und Herrn Prof. Dr. Bernd Honermeier danke ich für den Beitritt zur Prüfungskommission.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Dr. Marco A. Fraatz für die Diskussionen und die guten Tipps während der gesamten Promotion.

Mein Dank gilt außerdem:

allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie für das freundschaftliche Verhältnis und die gute Zusammenarbeit. Sensorische Untersuchungen sind ohne die Unterstützung des Arbeitskreises nicht möglich.

besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Laborkolleginnen Dr. Stephanie Riemer, Katrin Kunkel, Katharina Schmidt und Dipl. biol. Christiane Lauber sowie meinem Laborkollegen Alexander Heuger für viele anregende Diskussionen und für die angenehme Atmosphäre in unserem Labor/Büro. Sie waren stets in den richtigen Momenten Motivation, Unterstützung, Spaß, Freude und Trost.

meiner Masterstudentin Kerstin Stemme, die ich während ihrer Masterarbeit betreute, für die Entwicklung eines neuartigen Getränkes durch Einsatz von Basidiomyceten, besonders für ihren Durchhaltewillen und ihre gute Nase.

dem Institut für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische Technologie der Technischen Hochschule Mittelhessen besonders M. Sc. Hendrich Quitmann und Dipl.-Ing. Lorenz Zimmer für die Bereitstellung der Bierwürze.



der AG Fluidverfahrenstechnik der Technischen Universität Dortmund für die Pervaporation meines Kulturüberstandes.

der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen (AiF 299 ZN "Biotechnologische Erzeugung von hochwertigen Aromastoffen aus Nebenströmen der Lebensmittelindustrie") für die finanzielle Förderung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung, Trost und Nerven während meiner Studien- und Promotionszeit.

Zuletzt danke ich meinem Freund Marco für die Geduld, die er in den letzten Monaten mit mir hatte. Ohne seinen Rückhalt wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

# Veröffentlichungen

## *Publikationen*

**Kunkel K, Bosse AK, Fraatz MA, Zorn H** (2011) Produktion natürlicher Aromen mit Basidiomyceten. RFL; 63:383-384.

**Bosse AK, Fraatz MA, Zorn H** (2013) Formation of complex natural flavors by biotransformation of apple pomace with basidiomycetes. Food Chem 141:2952-2959.

## *Tagungsbeiträge*

**Bosse AK, Fraatz MA, Berger RG, Zorn H** (2011) Biotransformation lignocellulosehaltiger Substrate zu natürlichen Aromastoffen durch Basidiomyceten. Lebensmittelchemie 65:32.

**Kunkel K, Bosse AK, Fraatz MA, Berger RG, Zorn H** (2011) Biotransformation lignocellulose- und carotinoidhaltiger Substrate zu natürlichen Aromastoffen durch Basidiomyceten. Lebensmittelchemie 65:169.

**Bosse AK, Köhler I, Lauber C, Fraatz MA, Honermeier B, Zorn H** (2012) Charakterisierung von geruchsaktiven Inhaltsstoffen von *Origanum vulgare*-Subspezies nach Extraktion mittels Solvent Assisted Flavor Evaporation. Lebensmittelchemie 66:117.

**Zorn, H.; Berger, R. G.; Kunkel, K.; Bosse, A.; Fraatz, M. A.** Biotechnological applications of production streams: Basidiomycetes as aroma-producers. In *Ind. Gemeinschaftsforschung: Instrum. Innovativen Mittelstands, Aktuel. Beitr. FEI-Proj., Dok. FEI-Jahrestag*; Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V, 2011; S 75–84.

**Bosse AK, Stemme K, Fraatz MA, Zorn H** (2012) Production of novel beverages by fermentation of wort by edible basidiomycetes.ACHEMA 2012.

## *Patente*

**Quitmann H, Czermak P, Zorn H, Fraatz MA, Bosse A, Stemme K** (2011) Verfahren zur Herstellung eines Getränks oder einer Getränkebase. DE 10 2011 053 469.5.

# Kurzfassung

Insgesamt wurden 30 Basidiomyceten mit sieben verschiedenen Reststoffen der Lebensmittelindustrie als einziger Kohlenstoffquelle submers kultiviert. Sieben Pilz/Substratkombinationen wiesen sehr ansprechende Geruchseindrücke auf. Die Kultur von *Wolfiporia cocos* mit dem Substrat Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer) wies einen zitronigen, frischen, blumigen und würzigen Geruchseindruck auf. Die Verwendung von Weintresterpresskuchen als Substrat für *Tyromyces chioneus* resultierte in einer Kultur, die als süßlich, schwer, Trompetenbaumblüten wahrgenommen wurde. Die Biotransformationen von Apfeltrester durch *T. chioneus* führte zu einer Kultur mit dem Geruchseindruck nach Kompott, süßlich und Pflaumenmus. Diese drei Kulturen wurden mittels Gaschromatographie/Olfaktometrie (GC/O) und Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC/MS) analysiert. Die Hauptaromakomponenten wurden mittels Aromaextrakt-Verdünnungsanalyse (AEVA), Berechnung von Aromawerten und Rekonstruktion im Aromamodell bestimmt.

Die Biotransformation von Weintresterpresskuchen durch *W. cocos* führte zur Bildung der zwei Hauptaromakomponenten 2-Phenylethanol und (*E*)-Geraniol. Über die Kulturdauer von zehn Tagen wurde die Bildung dieser Hauptaromakomponenten durch Headspace Festphasenmikroextraktion Gaschromatographie-Massenspektroskopie (HS-SPME-GC/MS) bestätigt. Die höchsten Gehalte der Hauptaromakomponenten wurden an Kulturtag sechs festgestellt. Im Kulturverlauf wurden  $\alpha$ -Muurolen, Linalool, Octan-3-ol, Nonan-2-on, Undecan-2-on, Nonan-2-ol,  $\beta$ -Cadinen, Decan-2-on,  $\beta$ -Ocimen, Undecan-2-ol, Citral und Phenylelessigsäuremethylester gebildet. Als Hauptaromakomponenten der Kultivierung von *T. chioneus* mit Weintresterpresskuchen wurden mittels AEVA, analog zur Biotransformation von Apfeltrester, 3-Phenylpropanal und 3-Phenylpropanol identifiziert. Zusätzlich beeinflussten Phenylelessigsäure und Phenylelessigsäuremethylester das Aroma dieser Kultivierung. Die Biotransformation von Apfeltrester durch *T. chioneus* wurde durch die Biotransformationsprodukte 3-Phenylpropanal, 3-Phenylpropanol und Benzylalkohol geprägt. HS-SPME-GC/MS Experimente über die Kulturzeit von acht Tagen zeigten, dass Benzaldehyd, Linalool und  $\alpha$ -Farnesen im Kulturverlauf abgebaut wurden, während 3-Phenylpropanal, 3-Phenylpropanol, Benzylalkohol, Zimtaldehyd sowie die Methylester von Hydrozimsäure, Phenylelessigsäure und Zimtsäure gebildet wurden. Als Vorstufe der Biotransformationsprodukte wurde (*E*)-Zimtsäure mit Hilfe eines stabilisotopenmarkierten Standards identifiziert. Das Volumen wurde erfolgreich im Maßstab 40:1 auf vier Liter

vergrößert, eine Mediumoptimierung und -verschlinkung realisiert sowie eine Pervaporation der Kulturbrühe von *T. chioneus* mit dem Substrat unbehandelter Apfeltrester durchgeführt.

Zur Entwicklung eines neuartigen Getränks durch die Fermentation von flüssigen Substraten auf Getreide- und Leguminosenbasis wurden sieben Basidiomyceten mit fünf verschiedenen Substraten kultiviert und in einem zweiphasigen Screening zunächst olfaktorisch und dann gustatorisch evaluiert. Hierbei wurden fünf Substrat/Pilz-Kombinationen mit sehr ansprechendem Aroma entwickelt. Die vielversprechendsten Kombinationen wurden durch die Fermentation von ungehopfter Bierwürze durch die Basidiomyceten *W. cocos* (blumig, Zitrone, süß, Honig, Tee, herb), *T. chioneus* (stark blumig, süß, fruchtig, Honig) und *Ischnoderma benzoinum* (grün, Gras) gewonnen. Die fermentierten Getränke wurden flüssig/flüssig extrahiert und anschließend mittels GC/O und GC/MS analysiert. In der Fermentation durch *I. benzoinum* entstanden Zimtaldehyd und Isobuttersäure. *T. chioneus* aromatisierte die Bierwürze mit Phenylelessigsäuremethylester, Benzaldehyd, Furaneol, Propionsäure und Isobuttersäure. *W. cocos* bildete Linalool, Isobuttersäure, Benzylalkohol, Furaneol sowie Phenylelessigsäure.

## Abstract

Altogether 30 different basidiomycetes were grown submerged in liquid culture media using seven different by-products of the food industry as the only carbon source. Seven fungus/substrate combinations revealed interesting flavor profiles. The culture supernatants of *Wolfiporia cocos* grown on wine pomace of the vine variety Gewuerztraminer (culture odor: lemon, fresh, flowery, aromatic) and *Tyromyces chioneus* grown on apple pomace (culture odor: stewed fruit, sweetish, plum purée) and wine pomace (culture odor: sweetish, rich, indian bean) were extracted, and the aroma compounds were analyzed by gas chromatography/olfactometry (GC/O). Potent odorants were identified by aroma extract dilution analysis (AEDA), calculation of the odor activity values (OAV), and proven by confection of an aroma model.

Biotransformation of wine pomace by *W. cocos* led to two potent odorants 2-phenylethanol and (*E*)-geraniol. By headspace solid phase micro-extraction gas chromatography mass spectrometry (HS-SPME-GC/MS) during the cultivation period of ten days, a significant production of these biotransformation products with a maximum on day six was noticed. Concurrently  $\alpha$ -muurolene, linalool, octan-3-ol, nonan-2-one, undecan-2-one, nonan-2-ol,  $\beta$ -cadinene, decan-2-one,  $\beta$ -ocimene, undecan-2-ol, citral and methyl-2-phenylacetate were produced over ten days. The cultivation of *T. chioneus* with the substrate wine pomace generated 3-phenylpropanal, 3-phenylpropanol, phenylacetic acid and methyl-2-phenylacetate as potent odorants and biotransformation products. Likewise 3-phenylpropanal, 3-phenylpropanol, and benzyl alcohol were identified as aroma potent biotransformation products of apple pomace by *T. chioneus*. HS-SPME-GC/MS experiments showed that  $\alpha$ -farnesene, benzaldehyde, and linalool were degraded during a cultivation period of eight days, and 3-phenylpropanal, 3-phenylpropanol, benzyl alcohol, 3-phenylpropanoic acid methylester, methyl-2-phenylacetate, cinnamaldehyde and methyl cinnamate were produced. By labeling experiments using (*E*)-cinnamic acid, the precursor of 3-phenylpropanal, cinnamaldehyde and 3-phenylpropanol was identified. The media were optimized and the number of the used ingredients was reduced. The volume was scaled up to four liters (40:1), and a pervaporation of the culture broth of *T. chioneus* with apple pomace was performed.

For the development of a novel beverage, five different liquid substrates of cereal or legume origin were fermented by seven basidiomycetes. In a 2-phase screening, the cultivations were evaluated olfactorily and gustatorily and five fungus/substrate combinations

with a pleasant flavor were identified. The fermentations of unhopped wort by *W. cocos*, *T. chioneus*, and *Ischnoderma benzoinum* led to sweetish, flowery, fruity and green beverages. The promising cultures were liquid/liquid extracted and analyzed by GC/O and GC/MS. The cultivation of *I. benzoinum* flavored the wort with cinnamaldehyde and isobutyric acid. The fermentation by *T. chioneus* aromatized the drink with methyl-2-phenylacetate, benzaldehyde, furaneol and propionic acid. The cultivation of *W. cocos* with the liquid substrate wort led to a beverage flavored with linalool, isobutyric acid, benzyl alcohol, furaneol and phenylacetic acid.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Erklärung.....</b>	<b>I</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>II</b>
<b>Veröffentlichungen .....</b>	<b>IV</b>
<b>Kurzfassung.....</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Bisherige Kenntnisse .....	1
1.1.1 Substrate aus der Lebensmittelproduktion zur nachhaltigen Aromastoffproduktion .....	2
1.1.2 Biotechnologische Produktion von Aromastoffen durch Basidiomyceten .....	3
1.2 Zielsetzung .....	5
<b>2 Ergebnisse .....</b>	<b>6</b>
2.1 Biotransformation von Nebenströmen der Lebensmittelindustrie zu hochwertigen Aromastoffgemischen .....	6
2.1.1 Screening .....	6
2.1.2 Auswahl vielversprechender Stamm/Substrat-Kombinationen .....	8
2.1.3 Molekularbiologische Identifizierung von <i>T. chioneus</i> und <i>Pleurotus eous</i> .....	9
2.1.4 Biotransformation von Weintresterpresskuchen durch <i>T. chioneus</i> .....	11
2.1.4.1 Aroma-Analytik mittels Gaschromatographie.....	11
2.1.4.2 Optimierung der Medien – Biotransformation von Weintresterpresskuchen durch <i>T. chioneus</i> .....	19
2.1.5 Biotransformation von Weintresterpresskuchen durch <i>W. cocos</i> .....	21
2.1.5.1 Aroma-Analytik mittels Gaschromatographie.....	21
2.1.5.2 Bildung flüchtiger Verbindungen im Kulturverlauf von <i>W. cocos</i> mit dem Substrat unbehandelter Weintresterpresskuchen.....	27
2.1.5.3 Optimierung der Medien - Biotransformation von Weintrestern unterschiedlicher Anbaugelände .....	29
2.1.6 Biotransformation von Apfeltrester durch <i>T. chioneus</i> .....	30
2.1.6.1 Aroma-Analytik mittels Gaschromatographie.....	30
2.1.6.2 Bildung flüchtiger Verbindungen im Kulturverlauf von <i>T. chioneus</i> mit lyophilisiertem Apfeltrester .....	36
2.1.6.3 Optimierung der Medien – Biotransformation von Apfeltrester durch <i>T. chioneus</i> .....	38
2.1.6.4 Dotierung der Biotransformation von Apfeltrester durch <i>T. chioneus</i> mit möglichen Vorstufen der Biotransformationsprodukte .....	42
2.1.6.5 Einsatz von markierter ( <i>E</i> )-Zimtsäure als Präkursor für die Bildung der Biotransformationsprodukte 3-Phenylpropanal, Zimtaldehyd und 3-Phenylpropanol durch <i>T. chioneus</i> .....	44
2.1.6.6 Maßstabsvergrößerung der Biotransformation von Apfeltrester durch <i>T. chioneus</i> .....	47
2.1.6.7 Abtrennung der durch Fermentation von unbehandeltem Apfeltrester durch <i>T. chioneus</i> gewonnenen Aromastoffe mittels Pervaporation .....	52

2.2	Entwicklung neuartiger Getränke durch den Einsatz von essbaren Basidiomyceten .....	59
2.2.1	Screening .....	59
2.2.2	Auswahl der vielversprechendsten Getränkefermentationen .....	60
2.2.3	Ungehopfte Bierwürze .....	60
2.2.4	Fermentation von ungehopfter Bierwürze durch <i>I. benzoinum</i> .....	64
2.2.5	Fermentation von ungehopfter Bierwürze durch <i>T. chioneus</i> .....	67
2.2.6	Fermentation von ungehopfter Bierwürze durch <i>W. cocos</i> .....	70
<b>3</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>73</b>
3.1	GC/O und GC/MS in der Aromaanalytik.....	73
3.2	Biotransformation von Nebenströmen der Lebensmittelindustrie zu hochwertigen Aromaextrakten .....	75
3.2.1	Biotransformation von unbehandeltem Weintresterpresskuchen durch <i>T. chioneus</i> .....	76
3.2.2	Biotransformation von unbehandeltem Weintresterpresskuchen durch <i>W. cocos</i> . .....	78
3.2.3	Biotransformation von Apfeltrester durch <i>T. chioneus</i> .....	82
3.2.3.1	Supplementierung des Nährmediums mit potenziellen Vorstufen der Biotransformationsprodukte von Apfeltrester durch <i>T. chioneus</i> .....	86
3.2.4	Optimierung der Medien der Biotransformationen von unbehandeltem Weintresterpresskuchen und Apfeltrester durch <i>T. chioneus</i> .....	88
3.2.5	Maßstabsvergrößerung der Kultivierung von <i>T. chioneus</i> mit Apfeltrester .....	91
3.3	Entwicklung neuartiger Getränke durch den Einsatz von essbaren Basidiomyceten .....	94
3.3.1	Fermentierte Getränke.....	94
3.3.2	Ungehopfte Bierwürze .....	96
3.3.3	Fermentation von ungehopfter Bierwürze durch <i>I. benzoinum</i> .....	97
3.3.4	Fermentation von ungehopfter Bierwürze durch <i>T. chioneus</i> .....	99
3.3.5	Fermentation von ungehopfter Bierwürze durch <i>W. cocos</i> .....	101
<b>4</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>104</b>
<b>5</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>106</b>
5.1	Chemikalien und Geräte .....	106
5.2	Biotransformation von Nebenströmen der Lebensmittelindustrie zu hochwertigen Aromastoffgemischen .....	112
5.2.1	Substrate und Mikroorganismen .....	112
5.2.1.1	Substrate.....	112
5.2.2	Mikroorganismen .....	113
5.2.3	Kulturmedien .....	115
5.2.3.1	SNL-H-Agar .....	118
5.2.4	Kulturbegleitende Analytik .....	118
5.2.4.1	Bestimmung des Gesamtkohlenhydratgehaltes.....	118
5.2.4.2	Bestimmung des Gesamtstickstoffgehaltes nach Kjeldahl .....	119
5.2.4.3	Bestimmung der direkt reduzierenden Zucker und der reduzierenden Zucker nach Inversion nach Luff-Schoorl.....	119
5.2.5	Kultivierung der Basidiomyceten.....	120



5.2.5.1	Stammkultivierung.....	120
5.2.5.2	Submerskultur im Schüttelkolben (Vorkultur).....	120
5.2.5.3	Submerskultur im Schüttelkolben (Hauptkultur).....	120
5.2.5.4	Biotransformation von unbehandeltem Apfeltrester im 7,5-L-Fermenter .....	121
5.2.6	Kulturbegleitende sensorische Analyse .....	121
5.2.7	Molekularbiologische Identifizierung von Basidiomyceten.....	122
5.2.7.1	Isolierung der genomischen DNA .....	122
5.2.7.2	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	122
5.2.7.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	123
5.2.7.4	Sequenzierung.....	124
5.2.8	Gaschromatographie .....	124
5.2.8.1	Flüssig/flüssig-Extraktion.....	124
5.2.8.2	Headspace Festphasenmikroextraktion (HS-SPME) .....	126
5.2.8.1	Identifizierung der Aromastoffe.....	126
5.2.9	Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA).....	128
5.2.10	Abtrennung der durch Fermentation von unbehandeltem Apfeltrester durch <i>T. chioneus</i> gewonnenen Aromastoffe mittels Pervaporation.....	128
5.2.11	Sensorische Methoden .....	130
5.2.11.1	Bestimmung des Geruchsschwellenwertes .....	130
5.2.11.2	Aromamodell.....	131
5.3	Entwicklung neuartiger Getränke durch den Einsatz von essbaren Basidiomyceten .....	133
5.3.1	Substrate und Mikroorganismen .....	133
5.3.1.1	Verwendete Mikroorganismen.....	133
5.3.1.2	Verwendete Substrate für die Getränkeherstellung .....	134
5.3.2	Herstellung der Bierwürze.....	134
5.3.3	Kulturbegleitende Analytik .....	135
5.3.3.1	Bestimmung des Gesamtstickstoffgehaltes nach Kjeldahl .....	135
5.3.3.2	Bestimmung des Gesamtfettgehaltes nach Weilbull-Stoldt.....	135
5.3.3.3	Bestimmung der direkt reduzierenden Zucker und der reduzierenden Zucker nach Inversion nach Luff-Schoorl.....	135
5.3.4	Kultivierung der Basidiomyceten.....	136
5.3.4.1	Stammkultivierung.....	136
5.3.4.2	Submerskultur im Schüttelkolben (Vorkultur).....	136
5.3.4.3	Submerskultur im Schüttelkolben (Hauptkultur) für die Getränkeherstellung	136
5.3.1	Kulturbegleitende sensorische Analyse der Getränkefermentation .....	136
5.3.1.1	Phase 1 (olfaktorische Bewertung).....	136
5.3.1.2	Phase 2 (gustatorische Bewertung).....	136
5.3.2	Gaschromatographie .....	137
5.3.2.1	Flüssig/flüssig-Extraktion.....	137
5.3.2.2	Gaschromatographische Methoden nach flüssig/flüssig-Extraktion .....	137
5.3.2.3	Identifizierung der Aromastoffe.....	137
5.4	Entsorgung .....	138
5.4.1	Biologisches Material.....	138
5.4.2	Lösungsmittel und Chemikalien .....	138

---

<b>6</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>139</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>166</b>
7.1	Biotransformation von Nebenströmen der Lebensmittelindustrie zu hochwertigen Aromaextrakten .....	166
7.2	Entwicklung neuartiger Getränke durch den Einsatz von essbaren Basidiomyceten .....	223
7.3	Referenzsubstanzen .....	238

# Abkürzungsverzeichnis

A	Aromawert
AAO	Arylalkoholoxidase
ASU	Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren
bp	Basenpaar
BWZ	Bierwürze
BWZu	Bierwürze ungehopft
CBS	<i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i> , Utrecht, Niederlande
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
EBI	European Bioinformatics Institute
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
FD	<i>flavor dilution</i>
FE	Flächeneinheit
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
HD	Haferdrink
HS-SPME	Headspace Festphasenmikroextraktion
IBE	<i>Ischnoderma benzoinum</i>
KI	Kováts-Index
konz.	konzentriert
KP	Kakaopulver
Literatur	Lit.
MS	Massenspektroskopie
O	Olfaktometrie
ODP	<i>Olfactory Detection Port</i>
PAL	Phenylalanin-Ammoniak-Lyase

PCI	<i>Pleurotus citrinopileatus</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RD	Reisdrink
rpm	Umdrehungen pro Minute
SD	Sojadrink
SNL	Standardnährlösung
TB	Teigbruch
TCH	<i>Tyromyces chioneus</i>
u	unbehandelt
v/v	Volumen pro Volumen (bei Prozentangaben)
verd.	verdünnt
WB	Waffelbruch
WCO	<i>Wolfiporia cocos</i>
WT	Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer)
WT <sub>g</sub>	Weintrester (Gewürztraminer, Gengenbach)

# 1 Einleitung

## 1.1 Bisherige Kenntnisse

Der Wandel vom Jagen und Sammeln zur organisierten Lebensmittelproduktion fand vor ca. 10.000-15.000 Jahren im Nahen Osten statt. Aufzeichnungen, die die Produktion von Bier aus Gerste und von Wein aus Trauben dokumentieren, sind ca. 5.000 Jahre alt (Campbell-Platt 1994). Im 1. Buch Mose 9:20-21 wird deutlich, dass fermentierte Produkte gerne hergestellt und verzehrt wurden: „Noah aber fing an und ward ein Ackermann und pflanzte Weinberge. Und da er von den Weinbergen trank, ward er trunken und lag in der Hütte aufgedeckt“. Mikroorganismen, die in der traditionellen Lebensmittelbiotechnologie verwendet werden, modifizieren und verbessern das Aroma der hergestellten Produkte (Steinkraus 2009). Aroma und Aromastoffe beeinflussen seit Jahrhunderten das menschliche Handeln. Die Holländer tauschten die unbedeutende Insel Manhattan für den Zugang zur Muskatnuss ein und Christoph Kolumbus, Fernando Magellan und Vasco da Gama wurden mit der Aussicht auf den Handel mit Gewürzen zu ihren Expeditionsreisen motiviert (Czarra 2009).

Im Jahr 2008 konsumierten die Deutschen pro Kopf ca. 140 kg aromatisierte Lebensmittel. Hierbei handelte es sich hauptsächlich um Getränke. 70% der eingesetzten Aromastoffe waren natürliche Aromen (DVAI Deutscher Verband der Aromenindustrie e.V. 2012). Der Konsument wünscht Natürlichkeit und dieser Wunsch ist nicht nur auf Lebensmittel beschränkt, sondern betrifft auch Möbel, Kleider und Kosmetika (Berger *et al.* 2010). Artikel 3.2(c) der EU-Verordnung Nr. 1334/2008 besagt, dass ein natürlicher Aromastoff ein Aromastoff ist, der „durch geeignete physikalische, enzymatische oder mikrobiologische Verfahren aus pflanzlichen, tierischen oder mikrobiologischen Ausgangsstoffen gewonnen, die als solche verwendet oder mittels eines oder mehrerer der in Anhang II aufgeführten herkömmlichen Lebensmittelzubereitungsverfahren für den menschlichen Verzehr aufbereitet werden. Natürliche Aromastoffe sind Stoffe, die natürlich vorkommen und in der Natur nachgewiesen wurden“. Die Duft- und Geschmacksstoffindustrie hatte ein Absatzvolumen von 21.800 Mio. \$ weltweit in 2011 und die industrielle Nachfrage nach natürlichen Aromastoffen wächst kontinuierlich (Guentert 2007; Leffingwell & Associates 2012). Gleichzeitig nimmt das Volumen an Reststoffen durch die zunehmende Verarbeitung und Konfektionierung von Lebensmitteln stetig zu. Diese Reststoffe sind reich an

Komponenten wie Aminosäuren und Fettsäuren, die als biogenetische Vorstufen für Aromastoffe fungieren können.

### **1.1.1 Substrate aus der Lebensmittelproduktion zur nachhaltigen Aromastoffproduktion**

In Deutschland werden ca. 125 Mio. t Lebensmittel produziert. Hierbei fallen über 50 Mio. t Abfälle tierischen und pflanzlichen Ursprungs an. Bei der Herstellung von Frucht- und Gemüsesäften liegt der Anteil der Reststoffe bei durchschnittlich 40% (Carle und Schieber 2006). Fruchtsäfte und abgeleitete Produkte, wie z. B. Nektare erfreuen sich in den letzten Jahren immer größerer Beliebtheit. Im Jahr 2010 wurden 36,3 L Saft pro Kopf verbraucht (VDF Verband der deutschen Fruchtsaftindustrie 2012a). Die beliebtesten Säfte sind Apfelsaft, Orangensaft, Multivitaminsaft und Traubensaft (VDF Verband der deutschen Fruchtsaftindustrie 2012b). Auf Grund der gesteigerten Produktion stellt die Entsorgung der Reststoffe ein wachsendes Problem dar. Pflanzliches Material neigt zum mikrobiellen Verderb und ist so nicht mehr weiter nutzbar. Die Kosten für Trocknung, Lagerung und Transport sind limitierende Faktoren. Deswegen werden die Reststoffe momentan hauptsächlich verfüttert oder als Düngemittel verwendet. Die Nachfrage variiert aber entsprechend den landwirtschaftlichen Bedürfnissen, so dass die Reststoffe anderweitig entsorgt werden müssen. Die Entsorgung wird weiter durch rechtliche Einschränkungen wie die Bioabfallverordnung erschwert. Demzufolge wird eine effiziente, preisgünstige und umweltfreundliche Verwertung dieser Materialien immer wichtiger (Schieber und Carle 2001).

Weltweit werden auf 4,7 Mio. ha Anbaufläche 6,9 Mio. t Äpfel produziert (Food and Agriculture Organization 2012a, 2012b). 25-30% werden zu Saft, Cidre sowie gefrorenen und getrockneten Produkten verarbeitet. Die Gesamtausbeute dieses industriellen Prozesses beträgt 70-75%. Hierbei entsteht 25-30% Apfeltrester, der aus der Schale, den Kerngehäusen, den Kernen, der Calyx, dem Stiel und dem Parenchym besteht (Bhushan *et al.* 2008; Grigelmo-Miguel und Martín-Belloso 1999). Schätzungsweise werden in Deutschland 800.000 t Äpfel jährlich verarbeitet, wobei 200.000 t Apfeltrester anfallen (Binnig 2001). Dieser Reststoff verursacht nicht nur Entsorgungskosten, sondern stellt auch ein großes Umweltproblem dar (Bhushan *et al.* 2008; Vendruscolo *et al.* 2008). Momentan wird der Apfeltrester als Tierfuttermittel (50.000 t), für die Produktion von Biogas (50.000 t) und für die Produktion von Pektin (100.000 t) genutzt (Binnig 2001). Weitere mögliche Applikationen sind die Extraktion von Ballaststoffen, Proteinen und natürlichen Antioxidantien (Bhushan *et al.* 2008; Figuerola *et al.* 2005; Lavelli und Corti 2011; Sudha *et al.* 2007). Apfeltrester ist ein bekanntes Substrat für die Produktion

von Getränken mit einem geringen Alkoholgehalt (Bhushan *et al.* 2008), Enzymen (Favela-Torres *et al.* 2006; Zheng und Shetty 2000a, 2000b), organischen Säuren (Dhillon *et al.* 2011; Gullón *et al.* 2008; Shojaosadati und Babaeipour 2002), Ethanol (Ngadi und Correia 1992a; Ngadi und Correia 1992b), Speisepilzen (Worrall und Yang 1992), Futtermitteln (Devrajan *et al.* 2004), *Single Cell Protein* (Bhushan *et al.* 2008) und Aromastoffen (Bramorski *et al.* 1998; Bhushan *et al.* 2008; Medeiros *et al.* 2000).

In Deutschland fallen zusätzlich 265.000 t Weintrester an (Zeng *et al.* 2002). Für diesen Reststoff wurde eine große Vielfalt unterschiedlicher Applikationen entwickelt. Weintrester ist ein Substrat für die Produktion von hydrolytischen Enzymen (Botella *et al.* 2005; Díaz *et al.* 2007; Díaz *et al.* 2012), Biogas (Cáceres *et al.* 2012), Tierfuttermitteln (Goni *et al.* 2007), Xanthan (Stredansky und Conti 1999), Bioethanol (Rodríguez *et al.* 2010), alkoholischen Getränken (Silva und Malcata 1998) und Fruchtkörpern unterschiedlicher *Pleurotus*-Arten (Sanchez *et al.* 2002). Aus Weintrester werden durch Extraktion polyphenolische Komponenten (Cardona *et al.* 2009; Careri *et al.* 2003; Ping *et al.* 2011), Ballaststoffe (Deng *et al.* 2011) und Polysaccharide zur Produktion von Lebensmittelverpackungen (Deng und Zhao 2011) gewonnen.

### **1.1.2 Biotechnologische Produktion von Aromastoffen durch Basidiomyceten**

Basidiomyceten (Ständerpilze), zu denen fast alle Speisepilze gehören und von denen bis zu 30.000 verschiedene Arten bekannt sind, besitzen ein einzigartiges Enzymsystem (Bouws *et al.* 2008; Kirk und Ainsworth 2008). Sie sind in der Lage, komplexe Substrate, wie zum Beispiel Lignin und terpenreiche Biopolymere, zu nutzen (Pérez *et al.* 2002). Weißfäulepilze bauen Lignin zu unterschiedlichen aromatischen Monomeren ab, wie zum Beispiel Coniferylalkohol (Kirk 1971).

Ständerpilze sind in der Lage natürliche Aromastoffe, sowohl *de novo* als auch durch Biotransformation (Abbildung 1.1) zu bilden (Abraham und Berger 1994; Berger 2009; Fraatz und Zorn 2010, Krings und Berger 1998). *De novo* gebildete Aromastoffe von Basidiomyceten sind mit wertvollen Aromastoffen identisch, die aus Pflanzenmaterial isoliert wurden (Janssens *et al.* 1992).

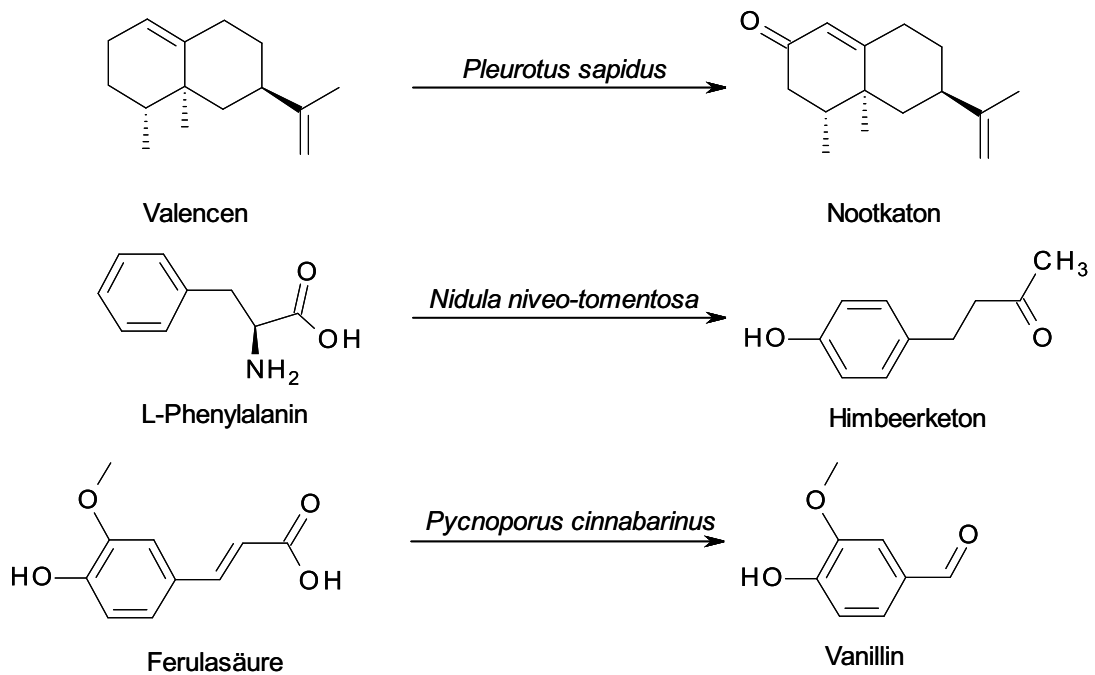


Abbildung 1.1: Biotransformation von Präkursoren zu Aromastoffen durch Basidiomyceten

Der Vogelneestpilz *Nidula niveo-tomentosa* transformiert L-Phenylalanin zu Himbeerketon (Zorn *et al.* 2003). *Pleurotus sapidus* produziert aus dem Sesquiterpenkohlenwasserstoff Valencen, einem Reststoff der Fruchtsaftindustrie, das Grapefruitaroma Nootkaton (Cane *et al.* 1990; Fraatz *et al.* 2009). Der mengenmäßig bedeutendste Aromastoff Vanillin entsteht durch Abbau der phenylpropanoiden Seitenkette von Ferulasäure durch die Zinnober-Tramete *Pycnoporus cinnabarinus* (Krings *et al.* 2001).



## 1.2 Zielsetzung

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt in der Nutzung von Basidiomyceten zur Transformation von Reststoffströmen der Lebensmittelindustrie zu komplexen Aromastoffgemischen. Hierbei wird das Konzept der fermentativen Aromaproduktion durch die traditionelle Lebensmittelbiotechnologie auf die Kultivierung der biochemisch komplexen Basidiomyceten übertragen. Zahlreiche Basidiomyceten werden auf unterschiedlichen Substraten kultiviert und bezüglich ihrer Fähigkeit, ansprechende Aromastoffgemische zu bilden, ausgewählt. Das Aromaprofil der vielversprechendsten Substrat/Pilz-Kombinationen wird ermittelt. Für eine ausgewählte Kultur wird der biogenetische Präkursor der Biotransformationsprodukte identifiziert. Um eine biotechnologische Verwendung zu ermöglichen, werden eine Mediumoptimierung und -verschlankung, eine Maßstabsvergrößerung sowie erste Schritte eines *Downstreaming Processing* mittels Pervaporation angestrebt.

Des Weiteren werden neuartige Getränke mittels Fermentation durch Basidiomyceten entwickelt. Hierfür werden zunächst Basidiomyceten mit verschiedenen flüssigen Substraten auf Leguminosen- oder Getreidebasis kultiviert und sensorisch beurteilt. Das Aromagemisch der vielversprechendsten Kombinationen wird identifiziert.

## 2 Ergebnisse

### 2.1 Biotransformation von Nebenströmen der Lebensmittelindustrie zu hochwertigen Aromastoffgemischen

#### 2.1.1 Screening

Für das Screening wurden 30 Basidiomyceten (Tabelle 5.6) submers in einem mit Reststoffen (Tabelle 5.5) supplementierten Medium (M2) kultiviert (Tabelle 5.7). Der jeweilige Reststoff war die einzige Kohlenstoffquelle für den Basidiomyceten. Gleichzeitig wurden zwei Blindwerte ermittelt, um den Einfluss des Substrates (Substrat<sub>BW</sub>) und die *de novo*-Genese der Aromastoffe durch den eingesetzten Pilz auf den Gesamtgeruchseindruck zu evaluieren (Pilz<sub>BW</sub>). Der Substrat<sub>BW</sub> wurde in dem gleichen hefefreien Medium geführt wie die Biotransformationen (M2). Im Medium des Pilz<sub>BW</sub> wurde das Substrat durch Glucose-Monohydrat substituiert (M1).

Zahlreiche Stamm/Substrat-Kombinationen wiesen ansprechende Geruchseindrücke auf (Tabelle 2.1) und unterschieden sich signifikant von den jeweiligen Substrat- (Substrat<sub>BW</sub>, Tabelle 2.2) und Pilz-Blindwerten (Pilz<sub>BW</sub>, Tabelle 2.3).

Tabelle 2.1: Geruchseindrücke nach der Biotransformation eines Substrates durch einen Basidiomyceten (Pilz<sub>Substrat</sub>)

Organismus	Substrat	Kultur-tag [d]	Geruchseindruck Pilz <sub>Substrat</sub>
<i>Clitocybe lignatilis</i>	Kakaopulver	5	Popcorn, Nuss, süßlich, (kein Kakao mehr)
<i>Marasmius cohortalis</i>	Weintresterpresskuchen	2	grün, frisch, Kräuter
<i>Nidula niveo-tomentosa</i>	Teigbruch	2	gebrannte Mandeln, Süßwarenstand (Weihnachtsmarkt)
<i>Pleurotus eryngii</i>	Teigbruch	2	Nuss, Haselnuss, süßlich, Schokolade
	Waffelbruch	2	staubig, Haselnuss

Organismus	Substrat	Kultur- tag [d]	Geruchseindruck Pilz <sub>Substrat</sub>
<i>Pleurotus sapidus</i>	Weintresterpress- kuchen	6	grün, frisch, aufgeschnittene Kiwi
	Apfeltrester	9	Popcorn, geröstet, Apfel
<i>Tyromyces chioneus</i>	Weintresterpress- kuchen	4	süßlich, schwer, Trompetenbaumblüten
	Apfeltrester	4	Kompott, süßlich, Pflaumenmus
<i>Wolfiporia cocos</i>	Weintresterpress- kuchen	6	Zitrone, frisch, blumig, würzig

Tabelle 2.2: Geruchseindrücke der Substrate im definierten Medium (Substrat<sub>BW</sub>)

Substrat	Abkürzung	Geruchseindruck Substrat <sub>BW</sub>
Apfeltrester	AT	alter Apfelsaft, Apfelkuchen, frisch gekeltert
Apfeltrester (unbehandelt; 5.2.1.1)	AT <sub>u</sub>	Apfeltrester, herb
Kaffeegrund	KG	alter Kaffeesatz, kaum Kaffeeearoma
Kakaopulver	KP	wässrig, Kakao, kakaohaltiges Heißgetränk
Kakaoschalen	KK	Kakao, Luftschokolade, staubig
Teigbruch	TB	Schokoladenteig, Keks, Rührkuchenteig
Waffelbruch	WB	Mehl
Weintresterpresskuchen	WT	Trester, dumpf, staubig
Weintresterpresskuchen (unbehandelt; 5.2.1.1)	WT <sub>u</sub>	Trester, dumpf, staubig
Weintrester	WT <sub>g</sub>	staubig, dumpf, Rosinen
Weintrester (unbehandelt; 5.2.1.1)	WT <sub>gu</sub>	Rosinen, Trockenfrüchte

Tabelle 2.3: Geruchseindrücke der Pilze im definierten glucosehaltigen Medium (Pilz<sub>BW</sub>)

Organismus	Abkürzung	Geruchseindruck Pilz <sub>BW</sub>
<i>C. lignatilis</i>	CLI	Chlor, Schimmel, muffig, feucht
<i>M. cohortalis</i>	MCO	staubig, pilzig, neutral
<i>N. niveo-tomentosa</i>	NNI	rauchig, süßlich, Tier
<i>P. eryngii</i>	PER	süßlich, staubig, Anisaldehyd
<i>P. sapidus</i>	PSA	Anisaldehyd, Pilz
<i>T. chioneus</i>	TCH	süßlich, muffig
<i>W. cocos</i>	WCO	zitronig, krautig, herb, Zitronenmelisse

Die Fermentationen der Substrate Kaffeegrund und Kakaoschalen wiesen keine ansprechenden olfaktorischen Eindrücke auf. Der Reststoff Apfeltrester brachte Kulturen mit fruchtigen und frischen Geruchseindrücken hervor. Die Verwendung der Substrate Kakaopulver, Waffelbruch und Teigbruch führte größtenteils zu Kulturen mit nussigen, gerösteten und süßlichen Geruchsnoten. Die Biotransformationen von Weintresterpresskuchen lieferten grüne, frische und blumige Geruchseindrücke.

Die Gesamtgeruchseindrücke der Substrat- und Pilzblindwerte waren während der Screeningphase sehr stabil und reproduzierbar (Anhang 7.1). Die olfaktorischen Bewertungen des sensorischen Panels waren für die ausgewählte Stamm/Substrat-Kombinationen (Tabelle 2.4) sehr gut reproduzierbar.

### 2.1.2 Auswahl vielversprechender Stamm/Substrat-Kombinationen

Nach Abschluss der Screeningphase (2.1.1) wurden die vielversprechendsten Stamm/Substrat-Kombinationen nach Evaluierung des sensorischen Eindruckes (Kultur nach Biotransformation) und Rücksprache mit dem projektbegleitenden Ausschuss im Rahmen des Projekttreffens im Mai 2010 (AiF 299 ZN "Biotechnologische Erzeugung von hochwertigen Aromastoffen aus Nebenströmen der Lebensmittelindustrie") sowie durch olfaktorische Beurteilung der daraus hergestellten Aromastoffextrakte (Tabelle 2.4, 5.2.8.1) ausgewählt.

*Tabelle 2.4: Geruchseindrücke der Aromaextrakte der Biotransformationen im Referenzmedium (M2)*

<b>Stamm/Substrat-Kombination</b>	<b>Kultur-abbruchtag [d]</b>	<b>Sensorischer Eindruck des Aromastoffextraktes nach Biotransformation</b>
WCO <sub>WTu</sub>	6	zitrus, frisch, blumig, fruchtig, Grapefruit, würzig
TCH <sub>WTu</sub>	4	blumig, schwer, süßlich, Trompetenbaumb Blüten, Honig, würzig
TCH <sub>AT</sub>	4	Kompott, süßlich, Pflaumenmus, würzig

### 2.1.3 Molekularbiologische Identifizierung von *T. chioneus* und *Pleurotus eous*

Die Basidiomyceten *T. chioneus* (DSMZ 5242) und *P. eous* (DSMZ 5331) wurden in der institutseigenen Stammsammlung geführt. Um die Pilze molekularbiologisch zu charakterisieren, wurde nach White *et al.* (1990) ein 606 bp großes Fragment aus der genomischen DNA mit den Primern ITS4 und ITS5 amplifiziert, welches die 5,8S ribosomale Untereinheit inklusive der flankierten ITS-Bereiche ITS1 und ITS2 (Internal Transcribed Spacer Region) codiert (Abbildung 2.1 und Abbildung 2.2).

```
GTCTACTTATAGGCCTGGGTGTGGGGGCTGACTCCCGGTGTGCACCTCTTGCCGTTGACCCA
CCAAGACACTTCCCCTTTGGGAAGTAAAAATCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGA
AGGATCATTATCGAGTTTTGAAAGGAGTTGTAGCTGGCCTCTCGAGGCATGTGCACGCTCCG
CTCATTTCCAACCTCTAACACCTGTGAACTAGCTGTAGGTCGGTTAGGAGTGGGCCTTTGCGGG
TCCCTTCGCGCCTTCCTATGTCTTTAACAACTCTTGTCGTATCAGAAATGTATTGCGGCTTTAT
AAACGCATCAATATAACTTTACGCAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGC
GAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTG
CGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCCGTTTGAGTGTATTGTATTCTCAAATCTCTTCGCT
TTTGTGAAGTTGATTTGGATTTGGAGGTCCTGCGGGTGACTTTGGTCGTCCGCTCCTCTTGAA
TGCATTAGCTGGAACCTTTTGCTAGACCAGCCTCGGTGTGATAATTATCTGCGCCGTGGTTGT
AAGGCGACTTTGTTGAGGATCCGCTTCCAATCGTCTTCGGACTTATTCTGACATCTGACCTCA
AATCGGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCCGGAGGAA
```

Abbildung 2.1: DNA-Sequenz der 5,8S ribosomalen Untereinheit mit flankierendem ITS-Bereich aus dem Basidiomyceten *T. chioneus* (DSMZ 5242)

Der Datenbankvergleich beim *European Bioinformatics Institute* (EBI-EMBL) der Sequenz mittels BLAST-Algorithmus ergab eine Homologie von bis zu 100% zu drei *T. chioneus* Stämmen (Tabelle 2.5).

Tabelle 2.5: Auswahl von Homologien der DNA-Sequenz der 5,8S ribosomalen Untereinheit mit dem flankierendem ITS-Bereich zu den Stämmen von *T. chioneus*

Zugriffsnr.	Organismus	Homologie [%]	E-Wert
AJ006676	<i>T. chioneus</i> , Sample 86	98	6,9 <sup>-138</sup>
AB369500	<i>T. chioneus</i> , QL57-3	99	2,5 <sup>-127</sup>
HQ659244.1	<i>T. chioneus</i> voucher Otto Miettinen 7487	100	3,6 <sup>-120</sup>

CATCCTGCTGCGAATTGCAGTGGAGTTGGAATCCTGCAGGGGCAGATGTACATCGCGGAGTC  
 CACAGTCGTTGCCCCGCTGCCTCTCAAGCTAGCCCCAGCCGGTTGGATCCTGCAGGCGGA  
 CAAGGACTCCAGAGCAGTCACTGATTGGCTTCTCGTCTGGGATCTGCTCAGCTTAGAGCTTAT  
 ACTCAGATAATGATCTCAGCGGCAGCAAGGGGCCATGGATTGAGGGGGAATAGTATTGGATG  
 GTTCGCAAAAATGACCCAGCGGTCCTCGAAGCTTTTTTCTCCCCCGTTTTGATATGCTTAA  
 GTTCAGCGGGTAGTCCTACCTGATTTGAGGTCAAATTGTCAAATTGTCCTTGCGGACGATTAG  
 AGAGCTGGACTCTATTCATGCGTGCTATTGATGAGTGATAATTATCACATCATGCGCAGAGGC  
 AATGAGAAGTCCTGCTAATGCATTTAAGAGGAGCCGACTTGTTACAGCCAGCAACCCCCAACA  
 ATCCAAACATCACAAATAAATGTGAGTTTGAGAATTTAATGACACTCAAACAGGCATGCCCTC  
 GGAATACCAAGGGGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCAC  
 ATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAA  
 GTTGTATTATGGTTTATAGGCACAAGGCCCATTAATGACATTCGTAGACATACATTTGGGGTG  
 TGTTAAGTAAATAGACTGCGTTGTACACCGAGACGTTTAAATCCCAGCAAACCAAGTCTGAC  
 GACTTGAAGGACGACTTCACAGATCTATCAAAAGTTCACAGGTGGTTGAAAGACTAGTGAAGC  
 GTGCACATGCCCTAGAGGCCAGCAACAACTCCATAGTGAATTCATTAATGATCCTTCCGCAG  
 GTTCACCTACGGAAACCTTGTTACGTTTTTACATTTTCAAATAAAATCTTCTGGACGGGAGAAT  
 GAAGATCACCGACCACTACAACAAACTTCTCCATCGTCGACGGTCCTGTAATGGCTGCCGAA  
 AACATATACATGAAGATCAACATTAGTTGAGCAAAGACCCCAACGTGACGCTATCAAATGCAG  
 CTGCTGGAGTTCAGTCCTCTCCAGGATCTCTCTCGTTTGGCCACGTAAAAAGCTAGCGGCGG  
 AAGGGCATTGTAATTCTTTCTATTTACTATCTTCTCATGAAGAATCCAAATCCTTAAACATTC  
 GCGTCTTCCTGCGCATTTGTCACTCTCTGAGGCTGCGCTGCGAGTCGAGA

Abbildung 2.2: DNA-Sequenz der 5,8S ribosomalen Untereinheit mit flankierendem ITS-Bereich aus dem Basidiomyceten *P. eous*

Der Datenbankvergleich (EMBL-EBI, WU-BLAST) der Sequenz ergab eine Homologie von 98% bzw. 99% zu sieben *Pleurotus sajor-caju* Stämmen und eine Homologie von 99% zu einem *Pleurotus pulmonarius voucher* Stamm (Tabelle 2.6). Ein Vergleich mit einem *P. eous* Stamm war nicht möglich, da keine genomischen Vergleichsdaten vorlagen.

Tabelle 2.6: Auswahl von Homologien der DNA-Sequenz der 5,8S ribosomalen Untereinheit mit dem flankierendem ITS-Bereich zu den Pleurotus Stämmen

Zugriffsnr.	Organismus	Homologie [%]	E-Wert
AY540328	<i>P. sajor-caju</i> S048	98	$1,9 \cdot 10^{-144}$
AY540329	<i>P. sajor-caju</i> S049	98	$1,9 \cdot 10^{-144}$
AY696300	<i>P. pulmonarius</i> voucher HMAS86396	99	$3,1 \cdot 10^{-144}$
FJ810164	<i>Lentinus sajor-caju</i> dd08058	98	$1,3 \cdot 10^{-143}$
FJ810157	<i>L. sajor-caju</i> dd08047	98	$3,1 \cdot 10^{-143}$
HM561983	<i>L. sajor-caju</i> FSC1	99	$3,5 \cdot 10^{-143}$
HM561984	<i>L. sajor-caju</i> FSC2	99	$3,5 \cdot 10^{-143}$
HM561989	<i>L. sajor-caju</i> PSC3	99	$3,5 \cdot 10^{-143}$

## 2.1.4 Biotransformation von Weintresterpresskuchen durch *T. chioneus*

### 2.1.4.1 Aroma-Analytik mittels Gaschromatographie

Die Biotransformation wurde mit ihren zugehörigen Substrat<sub>BW</sub> und Pilz<sub>BW</sub> flüssig/flüssig extrahiert und anschließend gaschromatographisch-massenspektrometrisch und gaschromatographisch-olfaktometrisch untersucht (5.2.8). Die Hauptaromakomponenten der Aromaextrakte der Biotransformation wurden mittels Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA) ermittelt (5.2.9). Die Gehalte der Hauptaromakomponenten wurden unter Verwendung des internen Standards Thymol quantifiziert (5.2.8). Aromawerte wurden für die Hauptaromakomponenten bestimmt (5.2.9) sowie im Aromamodell rekonstruiert (5.2.11.2).

### Blindwert unbehandelter Weintrester

Der Aromaextrakt des Blindwertes WT<sub>uBW</sub> wurde gaschromatographisch-olfaktometrisch untersucht (5.2.8.1). Dabei wurden 17 geruchsaktive Substanzen nachgewiesen, die in mindestens drei voneinander unabhängigen Läufen wahrgenommen wurden (Abbildung 2.3, Tabelle 2.7).

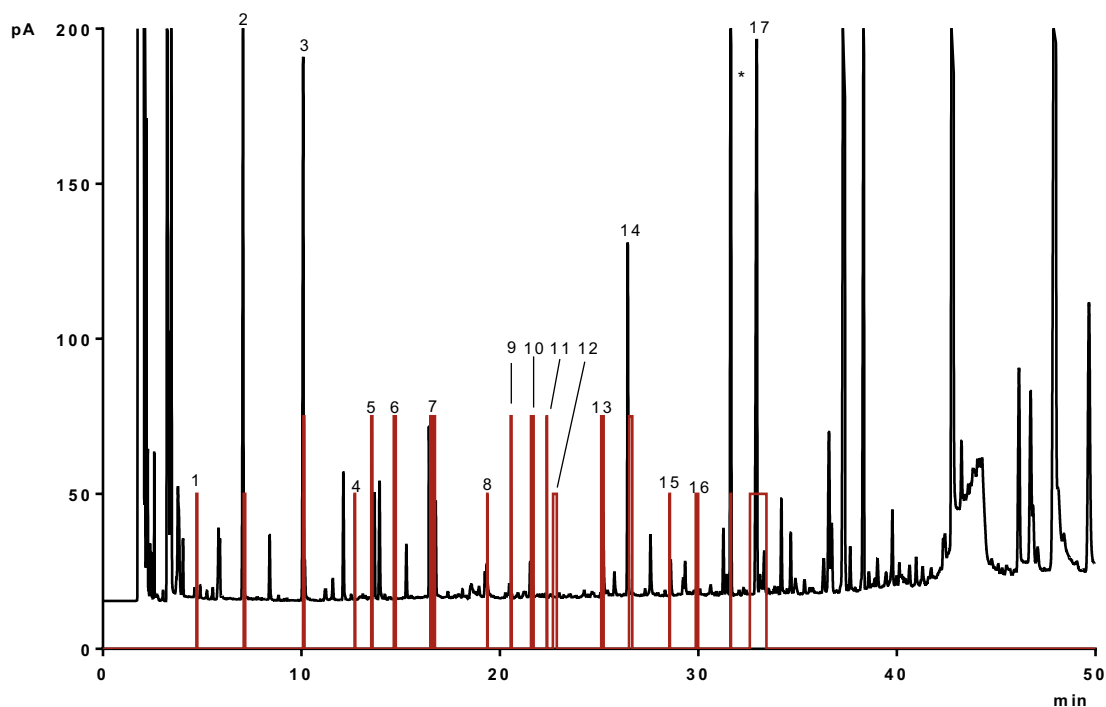


Abbildung 2.3: GC/FID/O-Chromatogramm des Blindwertes unbehandelter Weintresterpresskuchen (WTu<sub>BW</sub>, Tag 4) mit FID- (schwarz) und ODP-Spur (rot);  
\* = Interner Standard

Tabelle 2.7: Übersicht über die olfaktorisch wahrgenommenen Substanzen des Blindwertes unbehandelter Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer) (WTu<sub>BW</sub>, Tag 4) mit den zugehörigen Kováts-Indizes der Probe (KI), dem MS-Strukturvorschlag sowie dem Literaturgeruchseindruck

#	Geruchseindruck	KI GC/O HP- Innowax	KI GC/MS HP- Innowax	Strukturvorschlag	Geruch Lit.
1	süßlich, Alkohol	911		n.b.	
2	süßlich, geröstet, Schokolade, Brot	1079	1151	Butan-1-ol	medizinisch <sup>1</sup>
3	süßlich, Kakao, Brot	1195	1214	3-Methylbutan-1-ol	balsamisch, Alkohol <sup>1</sup>
4	Pilz	1273	1291	3-Hydroxybutan-2-on	Butter, beißend, Säure <sup>2</sup>
5	Teig, Brot, süßlich, Nuss	1333		n.b.	
6	Plastik, verbrannt	1363		n.b.	
7	Essig	1443	1471	Essigsäure	Essig <sup>3</sup>
8	muffig, herb, erdig	1457		n.b.	
9	herb, muffig	1566		n.b.	
10	Teig, Nuss, Brot	1615	1676	2-Furanmethanol	verbrannt, schweißig <sup>6</sup>
11	Käse	1663	1689	n.b.	
12	süßlich, frisch	1710		n.b.	



#	Geruchseindruck	KI GC/O HP- Innowax	KI GC/MS HP- Innowax	Strukturvorschlag	Geruch Lit.
13	süßlich, Vanille	1838	1891	Benzylalkohol	blumig, Trockenfrüchte <sup>4</sup>
14	Flieder, Rose, blumig	1899	1927	2-Phenylethanol	Rose <sup>5</sup>
15	süßlich, Gebäck, fruchtig, Zwiebel	2013	1988	2-Hexensäure	fettig, muffig <sup>1</sup>
16	minzig, frisch	2078		n.b.	
17	süßlich, Gewürze, Vanille	2257	2322	n.b.	

n.b.: keine sichere Zuordnung möglich, <sup>1</sup>(Lee und Noble 2003), <sup>2</sup>(Jordan *et al.* 2003), <sup>3</sup>(Culleré *et al.* 2004), <sup>4</sup>(Fang und Qian 2005), <sup>5</sup>(San-Juan *et al.* 2010), <sup>6</sup>(Chin *et al.* 2011)

Durch Vergleich der Massenspektren und ermittelten Kováts-Indizes der Probe mit denen authentischer Standards und Literaturdaten wurden sechs Aromastoffe identifiziert (Tabelle 2.8; Anhang 7.1 und 7.3).

*Tabelle 2.8: Mittels GC/MS identifizierte Aromastoffe des Blindwertes unbehandelter Weintrester (WTu<sub>BW</sub>) mit Literaturvergleichswerten*

Substanz	KI HP-Innowax			KI DB-5MS		
	GC/MS	Standard	Lit.	GC/MS	Standard	Lit.
Butan-1-ol	1151	1148	1156 <sup>1</sup>	<800	<800	670 <sup>1</sup>
3-Methylbutan-1-ol	1214	1211	1206 <sup>2</sup>	<800	738	735 <sup>3</sup>
3-Hydroxybutan-2-on	1291	1283	1291 <sup>4</sup>	<800	<800	733 <sup>5</sup>
Essigsäure	1471	1473	1477 <sup>6</sup>	<800	<800	700 <sup>5</sup>
2-Furanmethanol	1676	1676	1669 <sup>7</sup>	n.b.	859	860 <sup>8</sup>
Benzylalkohol	1891	1889	1869 <sup>9</sup>	n.b.	1038	1036 <sup>10</sup>
2-Phenylethanol	1927	1912	1916 <sup>11</sup>	1118	1115	1112 <sup>10</sup>
2-Hexensäure	1988	1971	1962 <sup>2</sup>	1031	1027	1047 <sup>12</sup>

n.b.: keine sichere Zuordnung möglich, <sup>1</sup>(Sun *et al.* 2010), <sup>2</sup>(Lee und Noble 2003), <sup>3</sup>(El-Sayed *et al.* 2005), <sup>4</sup>(Ferreira *et al.* 2001), <sup>5</sup>(Jordan *et al.* 2003), <sup>6</sup>(Culleré *et al.* 2004), <sup>7</sup>(Yanagimoto *et al.* 2004), <sup>8</sup>(Ho *et al.* 2007), <sup>9</sup>(Komes *et al.* 2006), <sup>10</sup>(Setzer *et al.* 2006), <sup>11</sup>(San-Juan *et al.* 2010), <sup>12</sup>(Kawasaki *et al.* 1998)

Analog wurde der Blindwert unbehandelter Weintresterpresskuchen WTu<sub>BW</sub> für sechs Tage geführt (siehe 2.1.5). Zusätzlich wurden 2-Methylpropan-1-ol und Butan-2,3-diol als Aromastoffe identifiziert. Butan-1-ol, Benzylalkohol und 2-Hexensäure wurden nach sechs Tagen nicht mehr als aromaaktive Substanzen identifiziert.

### Blindwert *T. chioneus*

Der Aromaextrakt des Blindwertes *T. chioneus* (TCH<sub>BW</sub>) nach vier Kulturtagen wurde gaschromatographisch-olfaktometrisch analysiert (5.2.8.1). Hierbei wurden sieben geruchsaktive Substanzen nachgewiesen, die in mindestens drei voneinander unabhängigen Läufen wahrgenommen wurden (Abbildung 2.4, Tabelle 2.9).

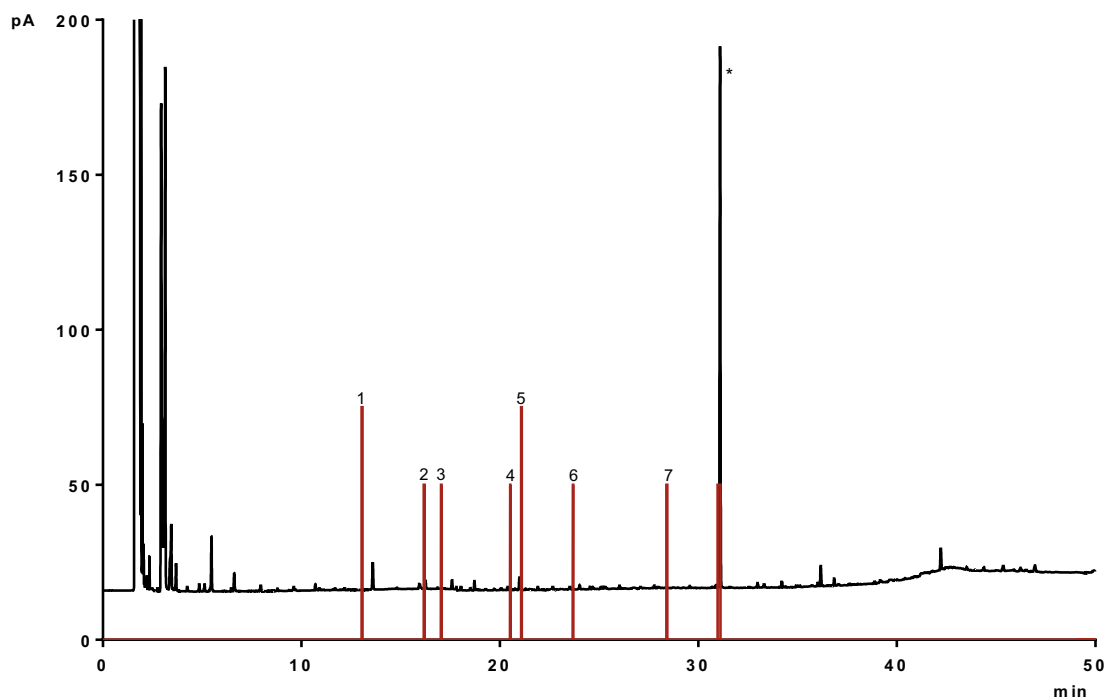


Abbildung 2.4: GC/FID/O-Chromatogramm des Blindwertes *T. chioneus* (TCH<sub>BW</sub>, Tag 4) mit FID- (schwarz) und ODP-Spur (rot); \* = Interner Standard

Tabelle 2.9: Übersicht über die olfaktorisch wahrgenommenen Substanzen des Blindwertes *T. chioneus* (TCH<sub>BW</sub>, Tag 4) mit den zugehörigen Kováts-Indizes der Probe (KI), dem MS-Strukturvorschlag sowie dem Literaturgeruchseindruck

#	Geruchseindruck	KI GC/O HP- Innowax	KI GC/MS HP- Innowax	Strukturvorschlag	Geruch Lit.
1	Nuss	1313	1369	4-Hydroxy-4-methyl- pentan-2-on	
2	muffig, Keller	1437	1471	Essigsäure	Essig <sup>1</sup>
3	muffig, säuerlich	1464	1475	Furfural	Holz, süß <sup>1</sup>
4	süßlich, Plastik, Knete	1611	1656		
5	Käse	1638		n.b.	
6	süßlich, frisch, Pflaume	1755		n.b.	
7	säuerlich	1980		n.b.	

n.b.: keine sichere Zuordnung möglich, <sup>1</sup>(Culleré *et al.* 2004),

Drei Aromastoffe wurden durch Vergleich der Massenspektren und der ermittelten Kováts-Indizes mit denen authentischer Standards und Literaturdaten identifiziert (Tabelle 2.10; Anhang 7.1 und 7.3).

Tabelle 2.10: Mittels GC/MS identifizierte aromaaktive Substanzen des Blindwertes *T. chioneus* ( $TCH_{BW}$ ) mit Literaturvergleichswerten

Substanz	KI HP-Innowax			KI DB-5MS		
	GC/MS	Standard	Lit.	GC/MS	Standard	Lit.
4-Hydroxy-4-methyl-pentan-2-on	1369	1356	1352 <sup>1</sup>	846	848	840 <sup>2</sup>
Essigsäure	1471	1473	1477 <sup>3</sup>	<800	<800	660 <sup>4</sup>
Furfural	1475	1459	1485 <sup>3</sup>	837	833	828 <sup>2</sup>

<sup>1</sup>(Osorio *et al.* 2006), <sup>2</sup>(Tellez *et al.* 1999), <sup>3</sup>(Culleré *et al.* 2004), <sup>4</sup>(Krist *et al.* 2005)

### Biotransformation von Weintresterpresskuchen durch *T. chioneus*

Der aus der Biotransformation von Weintresterpresskuchen durch *T. chioneus* ( $TCH_{WTu}$ ) gewonnene Aromaextrakt wurde gaschromatographisch-olfaktometrisch analysiert (5.2.8.1). Dabei wurden 17 geruchsaktive Substanzen nachgewiesen, die in mindestens drei voneinander unabhängigen Läufen wahrgenommen wurden (Abbildung 2.5, Tabelle 2.11).

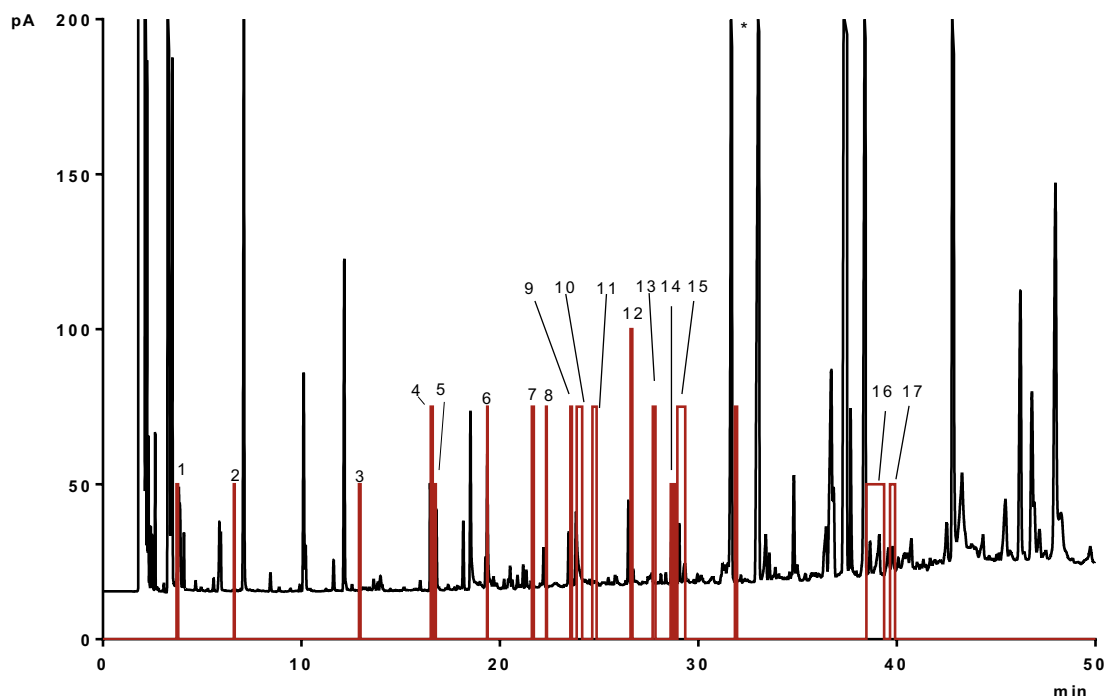


Abbildung 2.5: GC/FID/O-Chromatogramm der Biotransformation von unbehandeltem Weintresterpresskuchen durch *T. chioneus* ( $TCH_{WTu}$ , Tag 4) mit FID- (schwarz) und ODP-Spur (rot); \* = Interner Standard

Tabelle 2.11: Übersicht über die olfaktorisch wahrgenommenen Substanzen nach Biotransformation von Weintrester durch *T. chioneus* ( $TCH_{WTU}$ ; Tag 4) zusammen mit dem flavor-dilution-Faktor (FD-Faktor), den zugehörigen Kováts-Indizes der Probe (KI), dem MS-Strukturvorschlag sowie dem Literaturgeruchseindruck

#	Geruchseindruck	FD-Faktor	KI GC/O HP-Innowax	KI GC/MS HP-Innowax	Strukturvorschlag	Geruch Lit.
1	süßlich, Brot, Teig, Alkohol <sup>*</sup>	64	914		n.b.	
2	süßlich, säuerlich	32	1081	1092	2-Methylpropan-1-ol	grün, bitter <sup>1</sup>
3	Pilz	16	1276	1291	3-Hydroxybutan-2-on	Butter, beißend, Säure <sup>2</sup>
4	Essig	16	1425	1471	Essigsäure	Essig <sup>3</sup>
5	herb, Brot, muffig, Erde	8	1445	1477	Furfural	Holz, süß <sup>3</sup>
6	süßlich, Brause	4	1586		n.b.	
7	Käse	4	1669		n.b.	
8	herb, Trester	8	1693		n.b.	
9	süßlich, schwer, blumig, muffig	32	1754	1775	Phenylelessigsäuremethylester	Honig <sup>4</sup>
10	süßlich, schwer, Pflaume, Trompetenbaumb Blüten	1024	1772	1792	3-Phenylpropanal	grün, blumig <sup>5</sup>
11	herb, Trester, Nuss	8	1803		n.b.	
12	blumig, Flieder, Rose	512	1901	1926	2-Phenylethanol	Rose <sup>1</sup>
13	süßlich, Zwiebel	4	1963		n.b.	
14	süßlich, Vanille, Gebäck, Zwiebel	64	2037	2042	1H-Pyrrol-2-carboxaldehyd	
15	süßlich, frisch	16	2054	2063	3-Phenylpropanol	süß, blumig <sup>6</sup>
16	süßlich, verbrannt	128	2622	>2500	Phenylelessigsäure	Honig, blumig <sup>7</sup>
17	süßlich, Wachs	128	2748			

n.b.: keine sichere Zuordnung möglich, <sup>1</sup>(San-Juan *et al.* 2010), <sup>2</sup>(Jordan *et al.* 2003), <sup>3</sup>(Culleré *et al.* 2004), <sup>4</sup>(Steinhaus und Schieberle 2000), <sup>5</sup>(von Ranson und Belitz 1992), <sup>6</sup>(Lee *et al.* 2008), <sup>7</sup>(Escudero *et al.* 2007)

Als Hauptaromakomponenten der Kultivierung von *T. chioneus* mit Weintresterpresskuchen ( $TCH_{WTU}$ ) wurden mittels AEVA (Abbildung 2.6) 3-Phenylpropanal (FD = 1024), 2-Phenylethanol (FD = 512), 2-Methylpropan-1-ol (FD = 64) und 1H-Pyrrol-2-carboxaldehyd (FD = 64) identifiziert (Abbildung 2.6). Phenyllessigsäure (FD = 128) und eine bislang nicht identifizierte Aromakomponente (FD = 128, KI = 2748) trugen ebenfalls zum Gesamtaroma bei.

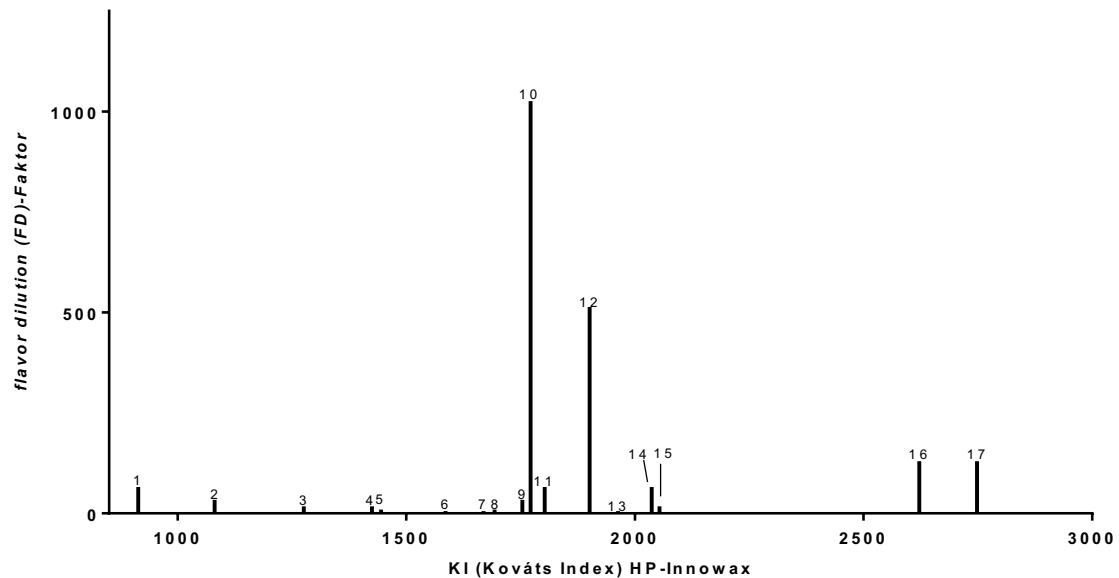


Abbildung 2.6: FD-Chromatogramm des durch flüssig/flüssig-Extraktion der Kultur der Biotransformation von Weintresterpresskuchen durch *T. chioneus* ( $TCH_{WTU}$ ) erhaltenen Aromaextraktes

Durch Vergleich der Massenspektren und ermittelten Kováts-Indizes der Probe mit denen authentischer Standards und Literaturdaten wurden neun Aromastoffe identifiziert (Tabelle 2.12; Anhang 7.1 und 7.3).

Tabelle 2.12: Mittels GC/MS identifizierte Aromastoffe aus der Biotransformation von Weintresterpresskuchen durch *T. chioneus* ( $TCH_{WTu}$ ) mit Literaturvergleichswerten

Substanz	KI HP-Innowax			KI DB-5MS		
	GC/MS	Standard	Literatur	GC/MS	Standard	Lit.
2-Methylpropan-1-ol	1092	1089	1099 <sup>1</sup>	<800	<800	653 <sup>9</sup>
3-Hydroxybutan-2-on	1291	1283	1291 <sup>2</sup>	<800	<800	682 <sup>10</sup>
Essigsäure	1471	1461	1477 <sup>3</sup>	<800	<800	660 <sup>11</sup>
Furfural	1477	1459	1485 <sup>3</sup>	834	833	828 <sup>2</sup>
Phenyllessigsäuremethylester	1775	1753	1758 <sup>4</sup>	1181	1181	1179 <sup>12</sup>
3-Phenylpropanal	1792	1774	1723 <sup>5</sup>	1166	1166	1162 <sup>13</sup>
2-Phenylethanol	1926	1912	1916 <sup>1</sup>	1118	1115	1112 <sup>14</sup>
3-Phenylpropanol	2063	2036	2039 <sup>6</sup>	1236	1233	1232 <sup>15</sup>
1H-Pyrrol-2-carboxaldehyd	2042	2014	2036 <sup>7</sup>	1112	1018	1013 <sup>16</sup>
Phenyllessigsäure	>2500	2548	2612 <sup>8</sup>	n.b.	1246	1262 <sup>17</sup>

n.b.: keine sichere Zuordnung möglich, <sup>1</sup>(San-Juan *et al.* 2010), <sup>2</sup>(Ferreira *et al.* 2001), <sup>3</sup>(Culleré *et al.* 2004), <sup>4</sup>(Steinhaus und Schieberle 2000), <sup>5</sup>(Fernandez *et al.* 2005), <sup>6</sup>(Mayorga *et al.* 2001), <sup>7</sup>(Yanagimoto *et al.* 2004), <sup>8</sup>(Escudero *et al.* 2007), <sup>9</sup>(Adediji *et al.* 1991), <sup>10</sup>(Takeoka *et al.* 1996), <sup>11</sup>(Krist *et al.* 2005), <sup>12</sup>(Pino *et al.* 2005), <sup>13</sup>(Buchin *et al.* 2002), <sup>14</sup>(Setzer *et al.* 2006), <sup>15</sup>(Shams-Ardakani *et al.* 2005), <sup>16</sup>(Kim *et al.* 2006), <sup>17</sup>(Schnermann und Schieberle 1997)

Die ermittelten Aromawerte der Hauptaromakomponenten (5.2.9) bestätigten die FD-Faktoren und die daraus resultierende Gewichtung der Einzelstoffe für das Aroma dieser Biotransformation (Tabelle 2.13).

Tabelle 2.13: Hauptaromakomponenten der Biotransformation von unbehandeltem Weintrester durch *T. chioneus* ( $TCH_{WTu}$ , Kulturtag 4) mit den Gehalten in der Kultur, den zugehörigen Geruchsschwellenwerten in Wasser und den Aromawerten (A)

Substanz	Konzentration [µg L <sup>-1</sup> Kultur] <sup>*</sup>	Geruchsschwellenwert in H <sub>2</sub> O [µg L <sup>-1</sup> ] <sup>*</sup>	A <sup>*</sup>
3-Phenylpropanal	305	3	98
3-Phenylpropanol	96	9	11
2-Phenylethanol	41	140 <sup>2</sup>	<1
2-Methylpropan-1-ol	625	1000 <sup>1</sup>	<1
Phenyllessigsäuremethylester	94	60 <sup>3</sup>	2
Phenyllessigsäure	142	1000 <sup>1</sup>	<1
1H-Pyrrol-2-carboxaldehyd	60	n.b.	

n.b.: Literaturwert nicht vorhanden, <sup>\*</sup>Werte auf ganze Zahlen gerundet, <sup>1</sup>(Rychlik *et al.* 1998),

<sup>2</sup>(Czerny *et al.* 2008), <sup>3</sup>(Serra Bonvehí 2005)

Zur Bestätigung der Hauptaromakomponenten dieser Biotransformation wurde ein Aromamodell in der Matrix Pentan/Diethylether (Rekombinat TCH<sub>WTu</sub>) rekonstruiert. Das Rekombinat wurde im Vergleich zu den gewonnenen Aromaextrakten (TCH<sub>WTu</sub>) im sensorischen Panel von mindestens fünf geschulten Personen evaluiert (5.2.11.2, Tabelle 2.14).

*Tabelle 2.14: Gesamtgeruchseindruck der Aromaextrakte der Biotransformationen von unbehandeltem Weintresterpresskuchen durch T. chioneus (TCH<sub>WTu</sub>, Kulturtag 4) und dem zugehörigen Aromamodell in der Matrix Pentan/Diethylether (1/1,12 v/v)*

Probe	Geruchseindruck	Intensität
TCH <sub>WTu</sub>	süßlich, schwer, blumig, würzig, Trompetenbaumblüten	5/5
Rekombinat TCH <sub>WTu</sub>	süßlich, schwer, blumig, frisch, Trompetenbaumblüten	4/5

#### 2.1.4.2 Optimierung der Medien – Biotransformation von Weintresterpresskuchen durch *T. chioneus*

Um eine kostengünstige und einfache Medienrezeptur zu entwickeln, wurden die Konzentrationen einzelner Medienkomponenten verringert. Hierfür wurde der Einfluss der zugesetzten Spurenelement- und Vitaminlösung (Medien M3 und M4) sowie der Stickstoffquelle Asparaginsäure (Medium M6) auf die Aromastoffbildung untersucht. Darüber hinaus wurde die Kultivierung in suspendiertem Substrat ohne weitere Zusätze (Medium M7) durchgeführt und analysiert. (Tabelle 2.15; Anhang 7.1 und 7.3).

*Tabelle 2.15: Geruchseindrücke der Biotransformationen mit verschlankten Medien nach vier Kulturtagen; zur Zusammensetzung der Medien siehe Tabelle 5.7*

Stamm/Substrat-Kombination	Medium	sensorischer Gesamteindruck
TCH <sub>WTu</sub>	M2 (Referenz)	süßlich, schwer, Trompetenbaumblüten
TCH <sub>WTu</sub>	M3	blumig, fruchtig, säuerlich
TCH <sub>WTu</sub>	M4	blumig, süßlich, Trompetenbaumblüten
TCH <sub>WTu</sub>	M6	blumig, süßlich, Trompetenbaumblüten
TCH <sub>WTu</sub>	M7	blumig, süßlich, Trompetenbaumblüten, metallisch

Die Kultivierung von *T. chioneus* mit Weintresterpresskuchen in den Medien M3, M4, M6 und M7 ohne Spurenelementlösung, Vitaminlösung und Asparaginsäure sowie allein in suspendiertem Substrat führte zu sehr ähnlichen Geruchseindrücken wie im Referenzmedium. Die Kultivierung im Medium M6 ohne Stickstoffquelle Asparaginsäure lieferte intensivere Geruchseindrücke als im Referenzmedium (M2). Die Kultivierung von *T. chioneus* in suspendiertem Substrat (M7) führte im Vergleich zum Referenzmedium zu einem intensiveren Aroma, allerdings war eine metallische Note wahrnehmbar.

Nach Kulturabbruch wurden die aromaaktiven Biotransformationsprodukte mit Hilfe des Internen Standards Thymol quantifiziert. Die modifizierten Medien führten zu einer geringeren Bildung der Hauptaromakomponente 3-Phenylpropanal (Abbildung 2.7).

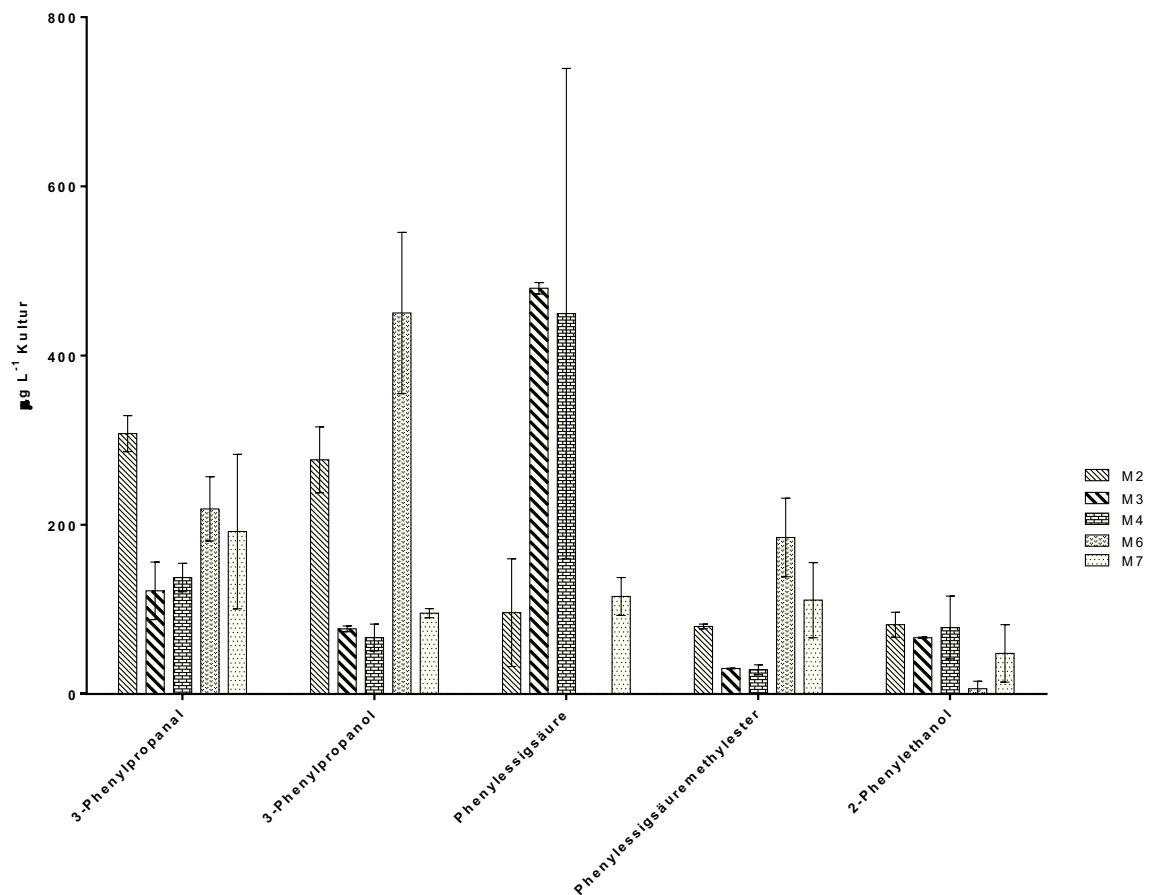


Abbildung 2.7: Gehalte ausgewählter Biotransformationsprodukte nach Fermentation von Weintresterpresskuchen durch *T. chioneus* ( $TCH_{WTU}$ ) ohne Spurenelementlösung, Vitaminlösung und Asparaginsäure (Medien M3, M4 und M6) sowie allein in suspendiertem Substrat (Medium M7) im Vergleich zum Referenzmedium (M2)



Der Verzicht auf Asparaginsäure im Medium M6 führte zu einer erhöhten Genese von 3-Phenylpropanol und Phenylelessigsäuremethylester. Im Medium M3 ohne Spurenelementlösung wurde vermehrt Phenylelessigsäure nachgewiesen. Die Kultivierung von *T. chioneus* im Medium ohne *Basal Medium Eagle* (BME)-Vitaminlösung (M4) resultierte ebenfalls in einer vermehrten Bildung von Phenylelessigsäure. Die Biotransformation von Weintresterpresskuchen durch *T. chioneus* im Medium M7, welche ausschließlich in suspendiertem Substrat kultiviert wurde, lieferte geringere Gehalte an 3-Phenylpropanol.

## **2.1.5 Biotransformation von Weintresterpresskuchen durch *W. cocos***

### **2.1.5.1 Aroma-Analytik mittels Gaschromatographie**

Die Biotransformation wurde mit ihren zugehörigen Substrat<sub>BW</sub> (WTu<sub>BW</sub>) und Pilz<sub>BW</sub> (WCO<sub>BW</sub>) flüssig/flüssig extrahiert und anschließend gaschromatographisch-massenspektrometrisch und gaschromatographisch-olfaktometrisch untersucht (WTu<sub>BW</sub>: 2.1.4.1, WCO<sub>BW</sub> und WTu<sub>WCO</sub>: 2.1.5.1). Die Hauptaromakomponenten der Aromaextrakte der Biotransformation wurden mittels AEVA ermittelt (5.2.9). Die Gehalte der Hauptaromakomponenten wurden unter Verwendung des internen Standards Thymol quantifiziert (5.2.8). Aromawerte wurden für die Hauptaromakomponenten bestimmt (5.2.9) sowie im Aromamodell rekonstruiert (5.2.11.2).

### **Blindwert *W. cocos***

Der Aromaextrakt des Blindwertes *W. cocos* (WCO<sub>BW</sub>) nach sechs Kulturtagen wurde gaschromatographisch-olfaktometrisch untersucht (5.2.8.1). Dabei wurden elf verschiedene geruchsaktive Substanzen detektiert, die in mindestens drei voneinander unabhängigen Läufen wahrgenommen wurden (Abbildung 2.8, Tabelle 2.16).

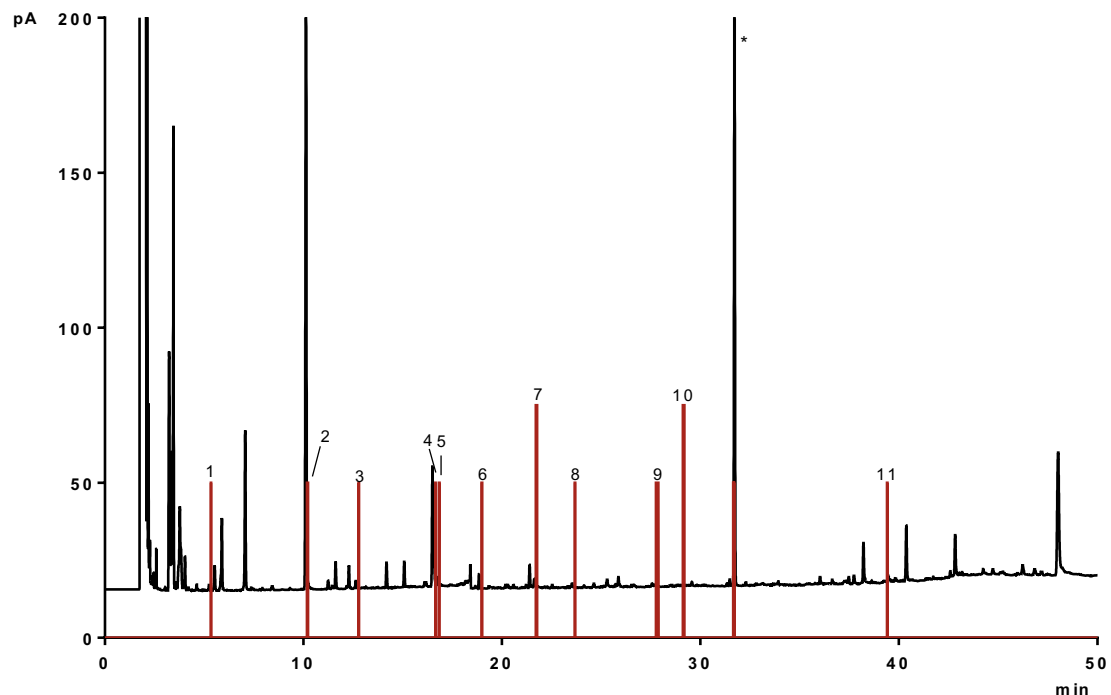


Abbildung 2.8: GC/FID/O-Chromatogramm des Blindwertes *W. cocos* ( $WCO_{BW}$ , Tag 6) mit FID- (schwarz) und ODP-Spur (rot); \* = Interner Standard

Tabelle 2.16: Übersicht über die olfaktorisch wahrgenommenen Substanzen des Blindwertes *W. cocos* ( $WCO_{BW}$ ; Tag 6) zusammen mit den zugehörigen Kováts-Indizes der Probe (KI), dem MS-Strukturvorschlag sowie dem Literaturgeruchseindruck

#	Geruchseindruck	KI GC/O HP- Innowax	KI GC/MS HP- Innowax	Strukturvorschlag	Geruch Lit.
1	süßlich	1062	1095	2-Methylpropan-1-ol	grün, bitter <sup>1</sup>
2	herb, süßlich	1229	1218	2-Methylbutan-1-ol	balsamisch, Alkohol <sup>2</sup>
3	Pilz	1309	1366	4-Hydroxy-4-methyl- pentan-2-on	
4	Essig	1477	1447	Essigsäure	Essig <sup>3</sup>
5	muffig	1487	1460	Oct-1-en-3-ol	Pilz <sup>4</sup>
6	süßlich, blumig, frisch	1577	1570	Linalool	fruchtig, grün, süßlich <sup>5</sup>
7	Käse	1691		n.b.	
8	süßlich, schwer	1793		n.b.	
9	säuerlich, süß, Vanille, Kräuter	1997		n.b.	
10	süßlich, Karamell	2104		n.b.	
11	süßlich, Pollen	2800		n.b.	

n.b.: keine sichere Zuordnung möglich, <sup>1</sup>(San-Juan *et al.* 2010), <sup>2</sup>(Högnadóttir und Rouseff 2003),  
<sup>3</sup>(Culleré *et al.* 2004), <sup>4</sup>(Lee *et al.* 2008), <sup>5</sup>(Choi 2003)

Sechs Aromastoffe wurden durch Vergleich der Massenspektren und ermittelten Kováts-Indizes mit denen authentischer Standards und Literaturdaten identifiziert (Tabelle 2.17; Anhang 7.1 und 7.3).

*Tabelle 2.17: Mittels GC/MS identifizierte aromaaktive Substanzen aus dem Blindwert *W. cocos* ( $WCO_{BW}$ ) mit Literaturvergleichswerten*

Substanz	KI HP-Innowax			KI DB-5MS		
	GC/MS	Standard	Lit.	GC/MS	Standard	Lit.
2-Methylpropan-1-ol	1095	1089	1099 <sup>1</sup>	<800	<800	653 <sup>7</sup>
2-Methylbutan-1-ol	1218	1204	1206 <sup>2</sup>	<800	<800	735 <sup>8</sup>
4-Hydroxy-4-methyl-pentan-2-on	1366	1356	1352 <sup>3</sup>	847	848	840 <sup>9</sup>
Essigsäure	1447	1461	1477 <sup>4</sup>	<800	<800	660 <sup>10</sup>
Oct-1-en-3-ol	1460	1446	1444 <sup>5</sup>	983	983	991 <sup>11</sup>
Linalool	1570	1545	1554 <sup>6</sup>	1101	1102	1098 <sup>6</sup>

<sup>1</sup>(San-Juan *et al.* 2010), <sup>2</sup>(Lee und Noble 2003), <sup>3</sup>(Osorio *et al.* 2006), <sup>4</sup>(Culleré *et al.* 2004), <sup>5</sup>(Lee *et al.* 2008), <sup>6</sup>(Choi 2003), <sup>7</sup>(Adedeji *et al.* 1991), <sup>8</sup>(El-Sayed *et al.* 2005), <sup>9</sup>(Tellez *et al.* 1999), <sup>10</sup>(Krist *et al.* 2005), <sup>11</sup>(Carrapiso *et al.* 2002)

### **Biotransformation von unbehandeltem Weintresterpresskuchen durch *W. cocos***

Der aus der Biotransformation von Weintresterpresskuchen durch *W. cocos* ( $WCO_{WTu}$ ) gewonnene Aromaextrakt wurde gaschromatographisch-olfaktometrisch analysiert (5.2.8.1). Dabei wurden 17 verschiedene geruchsaktive Substanzen nachgewiesen, die in mindestens drei voneinander unabhängigen Läufen wahrgenommen wurden (Abbildung 2.9, Tabelle 2.18).

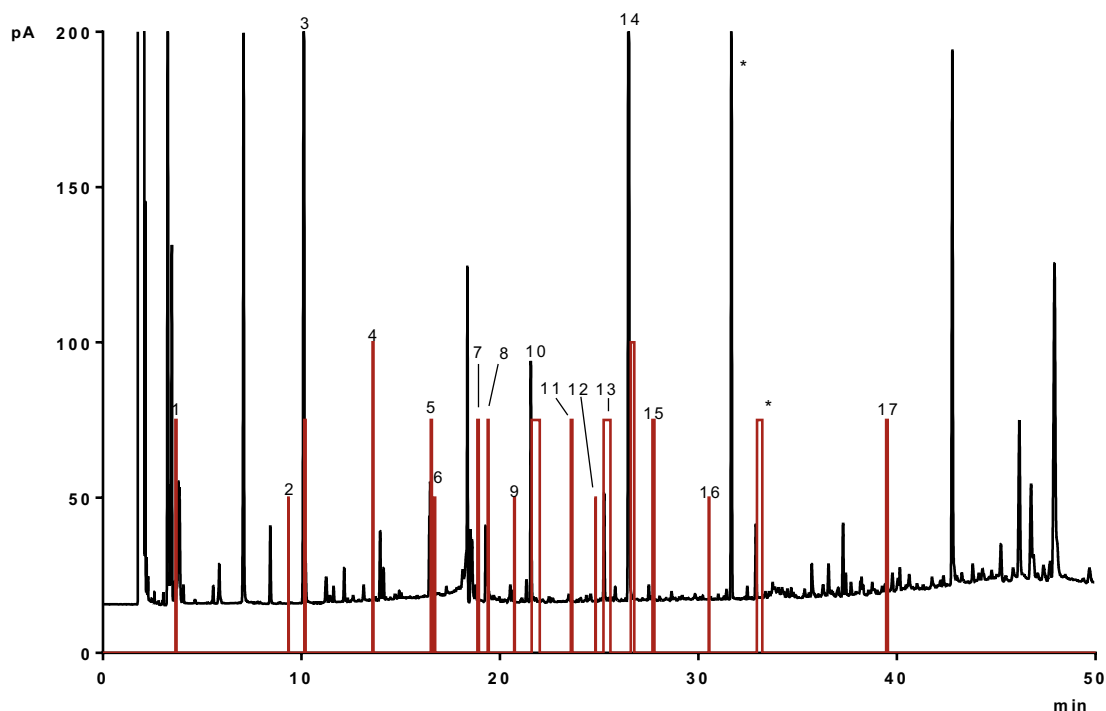


Abbildung 2.9: GC/FID/O-Chromatogramm der Biotransformation von unbehandeltem Weintresterpresskuchen durch *W. cocos* ( $WCO_{WTu}$ , Tag 6) mit FID- (schwarz) und ODP-Spur (rot);  
\* = Interner Standard

Tabelle 2.18: Übersicht über die olfaktorisch wahrgenommenen Substanzen nach Biotransformation von unbehandeltem Weintrester durch *W. cocos* ( $WCO_{WTu}$ ; Tag 6) zusammen mit dem flavor-dilution-Faktor (FD-Faktor), den zugehörigen Kováts-Indizes der Probe (KI), dem MS-Strukturvorschlag sowie dem Literaturgeruchseindruck

#	Geruchseindruck	FD-Faktor	KI GC/O HP-Innowax	KI GC/MS HP-Innowax	Strukturvorschlag	Geruch Lit.
1	süßlich, Kakao, Alkohol	2	755		n.b.	
2	süßlich, Kakao	1	1092	1092	2-Methylpropan-1-ol	grün, bitter <sup>1</sup>
3	herb, Brot, Teig	1	1209	1213	3-Methylbutan-1-ol	Käse <sup>3</sup>
4	Erdnuss, Nuss, geröstet	64	1358	1369	4-Hydroxy-4-methylpentan-2-on	
5	Essig	16	1457	1474	Essigsäure	Essig <sup>3</sup>
6	muffig, Keller	2	1469	1457	Oct-1-en-3-ol	Pilz <sup>4</sup>
7	herb, süßlich, frisch	16	1549		n.b.	
8	süßlich, seifig	1	1561	1555	Butan-2,3-diol	fruchtig, Zwiebel <sup>5</sup>
9	Käse	1	1630		n.b.	
10	Käse	64	1677	1691	2-Methylbuttersäure	Käse <sup>1</sup>
11	süßlich	8	1766		n.b.	
12	herb, Teig	1	1808		n.b.	

#	Geruchseindruck	FD-Faktor	KI GC/O HP-Innowax	KI GC/MS HP-Innowax	Strukturvorschlag	Geruch Lit.
13	süßlich, Vanille, blumig, schwer	8	1852	1859	(E)-Geraniol	Rose, Geranie <sup>2</sup>
14	blumig, Rose, Flieder	1024	1911	1929	2-Phenylethanol	Rose <sup>1</sup>
15	süßlich, schwer, Kräuter, würzig	64	1962		n.b.	
16	Minze, frisch	8	2083		n.b.	
17	süßlich, Vanille, Bienenwachs	16	2696		n.b.	

n.b.: keine sichere Zuordnung möglich, <sup>1</sup>(San-Juan *et al.* 2010), <sup>2</sup>(Högnadóttir und Rouseff 2003), <sup>3</sup>(Culleré *et al.* 2004), <sup>4</sup>(Lee *et al.* 2008), <sup>5</sup>(Giri *et al.* 2010)

2-Phenylethanol (FD = 1024), 4-Hydroxy-4-methylpentan-2-on (FD = 64), 2-Methylbuttersäure (FD = 64) und eine bislang nicht identifizierte Aromakomponente (FD = 64, KI 1962) stellten die Hauptaromakomponenten der Biotransformation von Weintresterpresskuchen mit *W. cocos* (WCO<sub>WTu</sub>) dar (Abbildung 2.10, Tabelle 2.20). Durch Vergleich der Massenspektren und ermittelten Kováts-Indizes der Probe mit denen authentischer Standards und Literaturdaten wurden acht Aromastoffe identifiziert (Tabelle 2.19; Anhang 7.1 und 7.3).

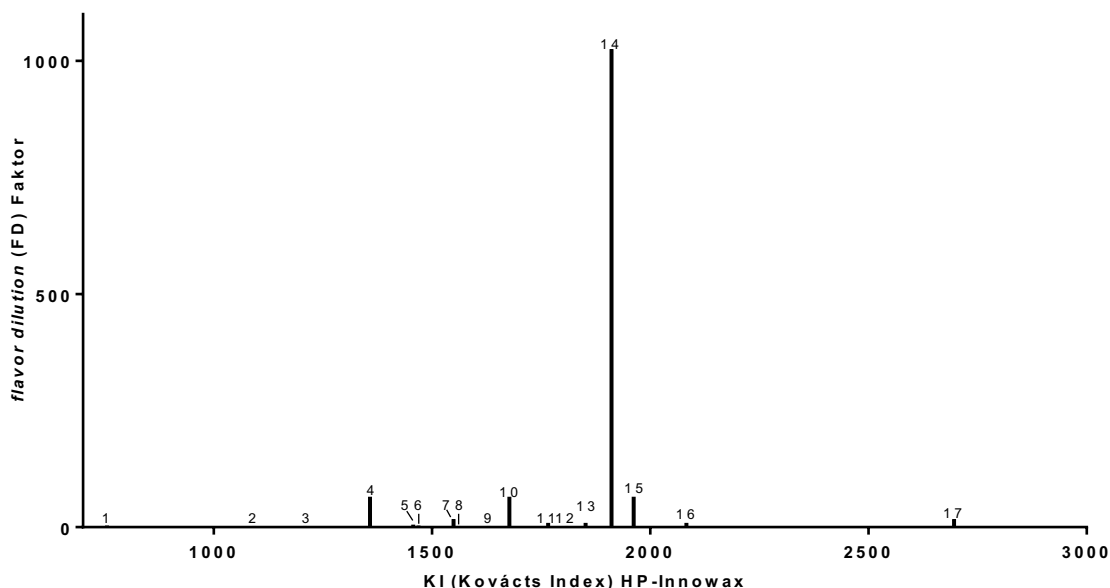


Abbildung 2.10: FD-Chromatogramm des durch flüssig/flüssig-Extraktion der Kultur der Biotransformation von Weintresterpresskuchen durch *W. cocos* (WCO<sub>WTu</sub>) erhaltenen Aromaextraktes

Tabelle 2.19: Mittels GC/MS identifizierte Aromastoffe aus der Biotransformation von Weintresterpresskuchen durch *W. cocos* (WCO<sub>WTu</sub>) mit Literaturvergleichswerten

Substanz	KI HP-Innowax			KI DB-5MS		
	GC/MS	Standard	Lit.	GC/MS	Standard	Lit.
2-Methylpropan-1-ol	1092	1089	1099 <sup>1</sup>	<800	<800	653 <sup>8</sup>
3-Methylbutan-1-ol	1213	1204	1206 <sup>2</sup>	<800	<800	735 <sup>9</sup>
4-Hydroxy-4-methylpentan-2-on	1369	1356	1352 <sup>3</sup>	845	848	840 <sup>10</sup>
Essigsäure	1474	1461	1477 <sup>4</sup>	<800	<800	660 <sup>11</sup>
Oct-1-en-3-ol	1457	1446	1444 <sup>5</sup>	984	983	991 <sup>12</sup>
Butan-2,3-diol	1555	1531	1559 <sup>6</sup>	<800	<800	768 <sup>13</sup>
2-Methylbuttersäure	1691	1664	1675 <sup>1</sup>	n.b.	882	873 <sup>14</sup>
(E)-Geraniol	1859	1839	1850 <sup>7</sup>	1260	1259	1258 <sup>15</sup>
2-Phenylethanol	1924	1912	1916 <sup>1</sup>	1117	1115	1112 <sup>16</sup>

n.b.: keine sichere Zuordnung möglich, <sup>1</sup>(San-Juan *et al.* 2010), <sup>2</sup>(Lee und Noble 2003), <sup>3</sup>(Osorio *et al.* 2006), <sup>4</sup>(Culleré *et al.* 2004), <sup>5</sup>(Lee *et al.* 2008), <sup>6</sup>(Giri *et al.* 2010), <sup>7</sup>(Högnadóttir und Rouseff 2003), <sup>8</sup>(Adedeji *et al.* 1991), <sup>9</sup>(El-Sayed *et al.* 2005), <sup>10</sup>(Tellez *et al.* 1999), <sup>11</sup>(Krist *et al.* 2005), <sup>12</sup>(Carrapiso *et al.* 2002), <sup>13</sup>(Buttery *et al.* 1994), <sup>14</sup>(Schnermann und Schieberle 1997), <sup>15</sup>(Chung *et al.* 1993), <sup>16</sup>(Setzer *et al.* 2006)

Tabelle 2.20: Hauptaromakomponenten der Biotransformation von unbehandeltem Weintrester durch *W. cocos* mit den Gehalten in der Kultur, den zugehörigen Geruchsschwellenwerten in Wasser und den Aromawerten (A)

Substanz	Konzentration [µg L <sup>-1</sup> Kultur]*	Geruchs-schwellenwert in H <sub>2</sub> O [µg L <sup>-1</sup> ]*	A*
2-Methylbuttersäure	146	540 <sup>1</sup>	<1
(E)-Geraniol	159	40 <sup>1</sup>	4
2-Phenylethanol	2071	140 <sup>2</sup>	15
4-Hydroxy-4-methylpentan-2-on	284	640 <sup>3</sup>	<1

\*Werte auf ganze Zahlen gerundet, <sup>1</sup>(Rychlik *et al.* 1998), <sup>2</sup>(Czerny *et al.* 2008), <sup>3</sup>(Amoore und Hautala 1983)

Die ermittelten Aromawerte bestätigen, dass 2-Phenylethanol die Hauptaromakomponente dieser Biotransformation war. Im Blindwert des Weintresterpresskuchens wurden deutlich geringere Gehalte an 2-Phenylethanol nachgewiesen (518 µg L<sup>-1</sup> Kultur). Mit Aromawerten von unter eins hatten 2-Methylbuttersäure und 4-Hydroxy-4-methylpentan-2-on keine Bedeutung für das Aroma der Biotransformation von unbehandeltem Weintresterpresskuchen durch *W. cocos*.

Zur Bestätigung der Hauptaromakomponenten dieser Biotransformation wurden Aromamodelle im Vergleich zu den Aromaextrakten in der Matrix Pentan/Diethylether (Rekombinat Aromaextrakt WCO<sub>WTu</sub>) und in der Matrix Referenzmedium M2 ohne Substratgabe (Rekombinat WCO<sub>WTu</sub>) rekonstruiert (5.2.11.2). Diese Aromamodelle wurden von einem Panel von geschulten Mitarbeitern olfaktorisch bewertet (Tabelle 2.21).

*Tabelle 2.21: Gesamtgeruchseindruck der Extrakte und des Kulturmediums der Biotransformationen von unbehandeltem Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer) durch *W. cocos* ( $WCO_{WTu}$ , Kulturtag 6) und den zugehörigen Aromamodellen in der Matrix Pentan/Diethylether (1/1,12 v/v) und Referenzmedium M2 ohne Substratgabe*

Probe	Geruchseindruck	Intensität
Aromaextrakt $WCO_{WTu}$	blumig, süßlich, 2-Phenylethanol, frisch, würzig	5/5
Rekombinat Aromaextrakt $WCO_{WTu}$	blumig, süßlich, 2-Phenylethanol, frisch	4/5
$WCO_{WTu}$	blumig, süßlich, zitrus, fruchtig, würzig	5/5
Rekombinat $WCO_{WTu}$	süßlich, schwer, blumig, 2-Phenylethanol, gekochte Früchte	2-3/5

#### **2.1.5.2 Bildung flüchtiger Verbindungen im Kulturverlauf von *W. cocos* mit dem Substrat unbehandelter Weintresterpresskuchen**

Um die Bildung der Aromastoffe im Kulturverlauf (Tag 0-10) zu ermitteln, wurden jeden Tag Proben der Kultivierung von *W. cocos* in unbehandeltem Weintresterpresskuchen entnommen, mittels HS-SPME extrahiert und gaschromatographisch-massenspektrometrisch analysiert (5.2.8.2). Die flüchtigen Verbindungen wurden durch den Vergleich der Massenspektren und ermittelten Kováts-Indizes der Probe mit Literaturdaten identifiziert (5.2.8.1; Anhang 7.1 und 7.3). Die Aromastoffe, deren Peakflächen sich im Kulturverlauf signifikant veränderten, wurden näher untersucht (Abbildung 2.11). Der Substratblindwerte  $WTu_{BW}$  und der Pilzblindwerte  $WCO_{BW}$  wurden parallel untersucht (Anhang 7.1 und 7.3 und Abbildung 7.63).

Im Zuge der Kultivierung erfolgte ein Abbau der Komponenten (Z)-Geraniol, Citronellol, Hexan-1-ol,  $\beta$ -Ionon, Caprinsäureethylester, Benzaldehyd und 2-Hexen-1-ol. Gleichzeitig bildeten sich  $\alpha$ -Muurolen, Linalool, Octan-3-ol, Nonan-2-on, Undecan-2-on, Nonan-2-ol,  $\beta$ -Cadinen, Decan-2-on,  $\beta$ -Ocimen, Undecan-2-ol, Citral und Phenyllessigsäuremethylester sowie (E)-Geraniol und 2-Phenylethanol. Die Maxima der aromarelevanten Biotransformationsprodukte (E)-Geraniol und 2-Phenylethanol wurden analog zum Kulturabbruch an Tag sechs mittels HS-SPME-GC/MS nachgewiesen.

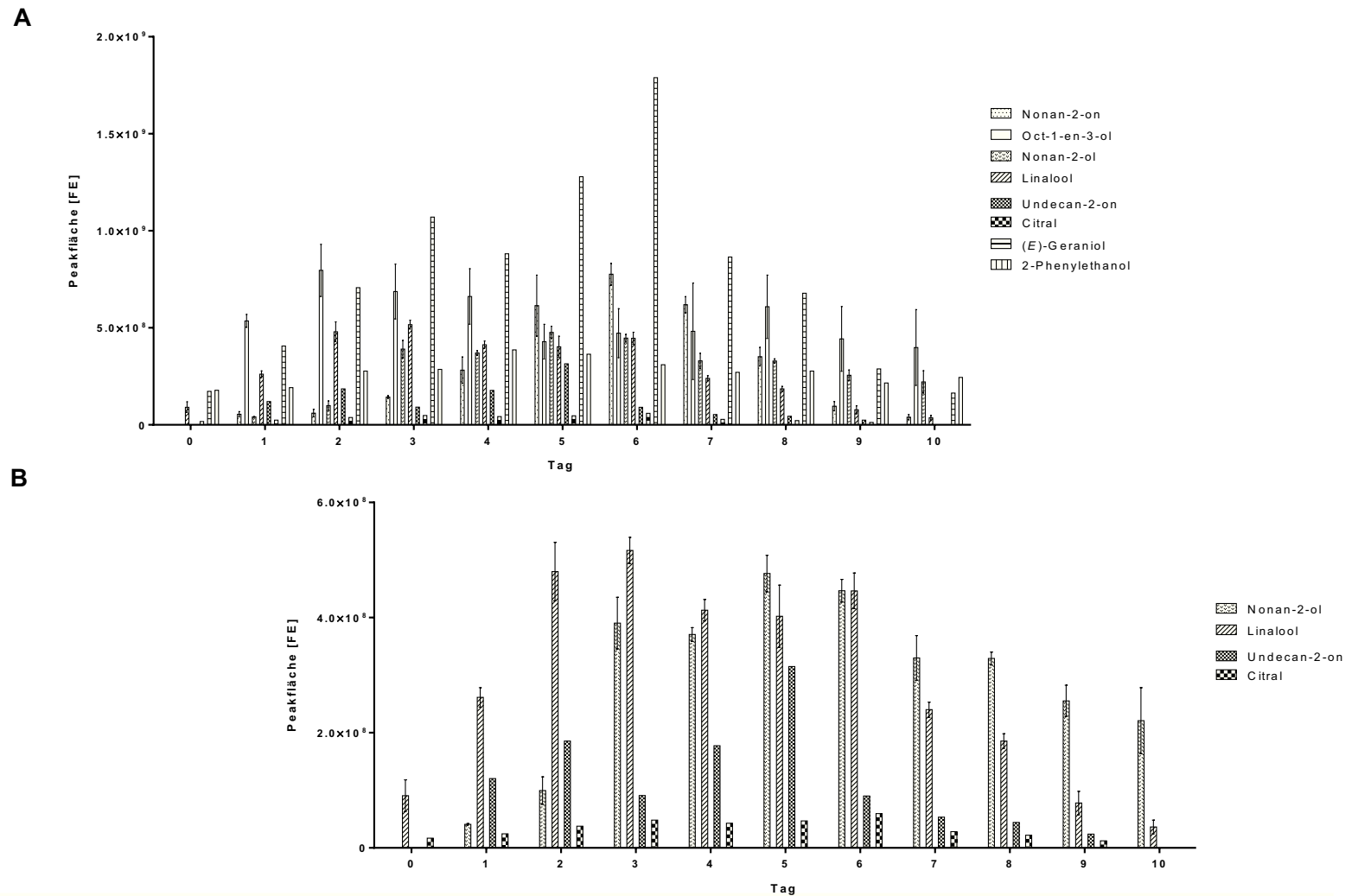


Abbildung 2.11: Bildung von Nonan-2-on, Oct-1-en-3-ol, Nonan-2-ol, Linalool, Undecan-2-on, Citral, (E)-Geraniol und 2-Phenylethanol im Kulturverlauf von *W. cocos* mit dem Substrat unbehandelter Weintresterpresskuchen (A); das Insert (B) zeigt die Bildung der Verbindungen, die Peakflächen von maximal  $3 \times 10^8$  aufwiesen



### 2.1.5.3 Optimierung der Medien - Biotransformation von Weintrestern unterschiedlicher Anbaugebiete

Um die Verwendung von Weintrester als Ersatz für Weintresterpresskuchen zu untersuchen, wurde entsprechend zur Kultivierung von *W. cocos* mit Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer, Neustadt/Weinstraße) ( $WCO_{WTu}$ , 2.1.5) ein Weintrester (Gewürztraminer, Gegenbach/Baden) als Substrat eingesetzt (Tabelle 2.22). Der Weintrester (Gegenbach) wurde lyophilisiert ( $WT_g$ ) und unbehandelt ( $WT_{gu}$ ) als Substrat zur Biotransformation durch *W. cocos* ( $WCO_{WTgu}$ ) im Referenzmedium (M2) eingesetzt (5.2.1.1).

Tabelle 2.22: Geruchseindrücke der Biotransformation von Weintrester (Gewürztraminer, Gegenbach) durch *W. cocos* nach Kulturabbruch (6 Tage) im Referenzmedium (M2)

Stamm/Substrat-Kombination	sensorischer Gesamteindruck
$WCO_{WTg}$	zitrus, frisch, süßlich
$WCO_{WTgu}$	zitrus, frisch, blumig, Mandarine

Die mittels flüssig/flüssig-Extraktion gewonnenen Aromaextrakte der Pilz/Substrat-Kombinationen und der zugehörigen Substrat-Blindwerte wurden gaschromatographisch-massenspektrometrisch analysiert (5.2.8.1; Anhang 7.1 und 7.3).

Die Biotransformation von  $WCO_{WTgu}$  führte entsprechend zur Biotransformation des Weintresterpresskuchens durch *W. cocos* (2.1.5) zur Genese von 2-Phenylethanol ( $912 \mu\text{g L}^{-1}$ ) und (*E*)-Geraniol ( $65 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Zusätzlich wurde die Bildung von Linalool ( $13 \mu\text{g L}^{-1}$ ) detektiert. Die ermittelten Gesamtgeruchseindrücke sowie die Zusammensetzung der Aromastoffe entsprachen den Kultivierungen mit Weintresterpresskuchen als Kohlenstoffquelle. Der lyophilisierte Weintrester führte bei der Fermentation mit *W. cocos* (Gegenbach;  $WCO_{WTg}$ ) zu ähnlichen Gehalten an 2-Phenylethanol ( $1.044 \mu\text{g L}^{-1}$ ) und einer höheren Bildung von (*E*)-Geraniol ( $213 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Zusätzlich wurden Phenylelessigsäuremethylester ( $101 \mu\text{g L}^{-1}$ ), Octan-3-ol ( $47 \mu\text{g L}^{-1}$ ), Linalool ( $26 \mu\text{g L}^{-1}$ ) und Undecan-2-ol ( $23 \mu\text{g L}^{-1}$ ) detektiert. Der sensorische Eindruck war vergleichbar.

## 2.1.6 Biotransformation von Apfeltrester durch *T. chioneus*

### 2.1.6.1 Aroma-Analytik mittels Gaschromatographie

Die Biotransformation wurde mit ihren zugehörigen Substrat<sub>BW</sub> (AT<sub>BW</sub>) und Pilz<sub>BW</sub> (TCH<sub>BW</sub>) flüssig/flüssig extrahiert und anschließend gaschromatographisch-massenspektrometrisch und gaschromatographisch-olfaktometrisch untersucht (TCH<sub>BW</sub>: 2.1.4.1; AT<sub>BW</sub> und TCH<sub>AT</sub>: 2.1.6.1). Die Hauptaromakomponenten der Aromaextrakte der Biotransformation wurden mittels AEVA ermittelt (5.2.9). Die Gehalte der Hauptaromakomponenten wurden unter Verwendung des internen Standards Thymol quantifiziert (5.2.8). Aromawerte wurden für die Hauptaromakomponenten bestimmt (5.2.9) sowie im Aromamodell rekonstruiert (5.2.11.2).

#### Substrat Blindwert lyophilisierter Apfeltrester

Der Aromaextrakt des Blindwertes lyophilisierter Apfeltrester (AT<sub>BW</sub>) nach vier Kulturtagen wurde gaschromatographisch-olfaktometrisch untersucht (5.2.8.1). Dabei wurden neun geruchsaktive Substanzen detektiert, die in mindestens drei voneinander unabhängigen Läufen wahrgenommen wurden (Abbildung 2.12, Tabelle 2.23).

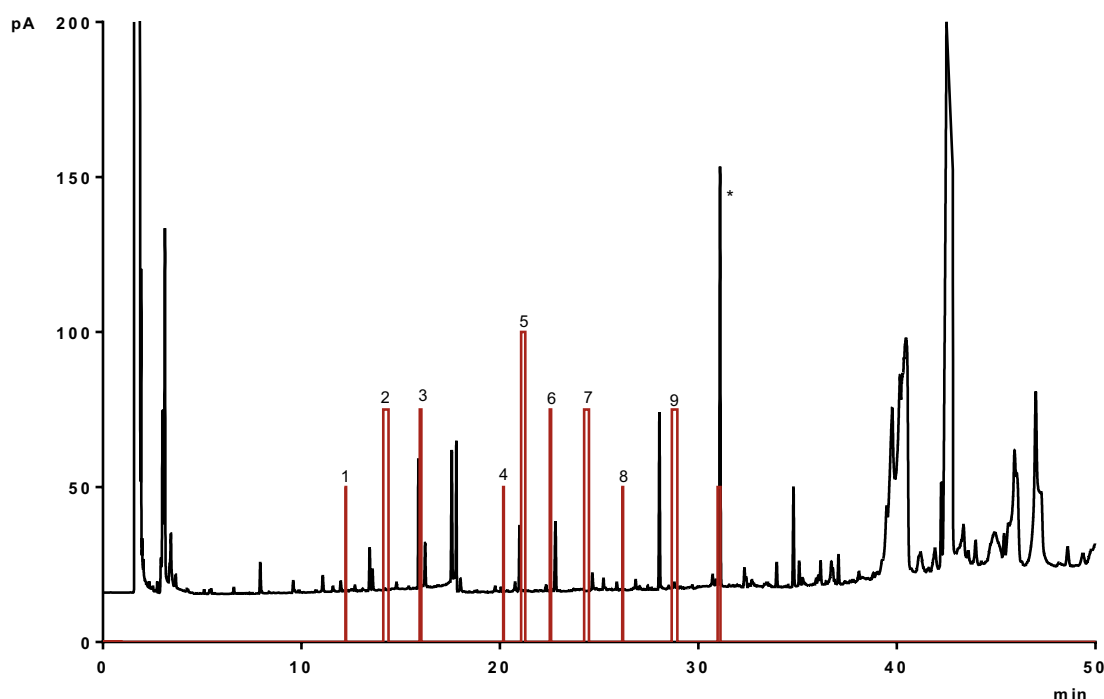


Abbildung 2.12: GC/FID/O-Chromatogramm des Blindwertes lyophilisierter Apfeltrester (AT<sub>BW</sub>, Tag 4) mit FID- (schwarz) und ODP-Spur (rot); \* = Interner Standard

Tabelle 2.23: Übersicht über die olfaktorisch wahrgenommenen Substanzen des Blindwertes lyophilisierter Apfeltrester ( $AT_{BW}$ , Tag 4) mit den zugehörigen Kováts-Indizes der Probe (KI), dem MS-Strukturvorschlag sowie dem Literaturgeruchseindruck

#	Geruchseindruck	KI GC/O HP- Innowax	KI GC/MS HP- Innowax	Strukturvorschlag	Geruch Lit.
1	Pilz	1270	1268	4-Methylpyrimidin	
2	verbrannt, Plastik	1357	1368	4-Hydroxy-4-methyl- pentan-2-on	
3	Essig	1422	1464	Essigsäure	Essig <sup>1</sup>
4	muffig, Keller, Käse	1593	1531	Benzaldehyd	verbrannter Zucker, Mandel <sup>2</sup>
5	süßlich, sauer, Apfel	1639	1688	2-Methylbuttersäure	süßlich <sup>3</sup>
6	süßlich, frisch, grün	1722		n.b.	
7	herb, Teig, Knete	1790	1765	$\alpha$ -Farnesen	holzig <sup>4</sup>
8	süßlich, blumig	1871	1889	n.b.	
9	süßlich, Karamell	2020	2040	1H-Pyrrol- 2-carboxaldehyd	

n.b.: keine sichere Zuordnung möglich, <sup>1</sup>(Culleré *et al.* 2004), <sup>2</sup>(Valim *et al.* 2003), <sup>3</sup>(Rychlik *et al.* 1998), <sup>4</sup>(Chung *et al.* 1993)

Durch Vergleich der Massenspektren und der ermittelten Kováts-Indizes der Probe mit denen authentischer Standards und Literaturdaten wurden fünf Aromastoffe identifiziert (Tabelle 2.24; Anhang 7.1 und 7.3).

Tabelle 2.24: Mittels GC/MS identifizierte aromaaktive Substanzen des Blindwertes lyophilisierter Apfeltrester ( $AT_{BW}$ ) mit Literaturvergleichswerten

Substanz	KI HP-Innowax			KI DB-5MS		
	GC/MS	Standard	Lit.	GC/MS	Standard	Lit.
4-Methylpyrimidin	1268	1309	+	n.b.	1037	853 <sup>10</sup>
4-Hydroxy-4-methyl- pentan-2-on	1368	1356	1352 <sup>1</sup>	846	848	840 <sup>2</sup>
Essigsäure	1464	1473	1477 <sup>3</sup>	<800	<800	660 <sup>4</sup>
Benzaldehyd	1531	1515	1500 <sup>5</sup>	963	964	965 <sup>5</sup>
2-Methylbuttersäure	1688	1664	1675 <sup>6</sup>	n.b.	882	873 <sup>7</sup>
$\alpha$ -Farnesen	1765	1746	1772 <sup>8</sup>	1509	1488	1518 <sup>5</sup>
1H-Pyrrol-2-carboxaldehyd	2040	2014	2036 <sup>8</sup>	1019	1018	1013 <sup>9</sup>

+ keine Literaturwerte vorhanden, n.b.: keine sichere Zuordnung möglich, <sup>1</sup>(Osorio *et al.* 2006), <sup>2</sup>(Tellez *et al.* 1999), <sup>3</sup>(Culleré *et al.* 2004), <sup>4</sup>(Krist *et al.* 2005), <sup>5</sup>(Chung *et al.* 1993), <sup>6</sup>(San-Juan *et al.* 2010), <sup>7</sup>(Schnermann und Schieberle 1997), <sup>8</sup>(Mayorga *et al.* 2001), <sup>9</sup>(Kim *et al.* 2006), <sup>10</sup>(Lu *et al.* 2005)

### Biotransformation von Apfeltrester durch *T. chioneus*

Der aus der Biotransformation von Apfeltrester durch *T. chioneus* (TCH<sub>AT</sub>) nach vier Kulturtagen gewonnene Aromaextrakt wurde gaschromatographisch-olfaktometrisch analysiert (5.2.8.1) und 14 geruchsaktive Substanzen nachgewiesen, die in mindestens drei voneinander unabhängigen Läufen wahrgenommen wurden (Abbildung 2.13, Tabelle 2.25).

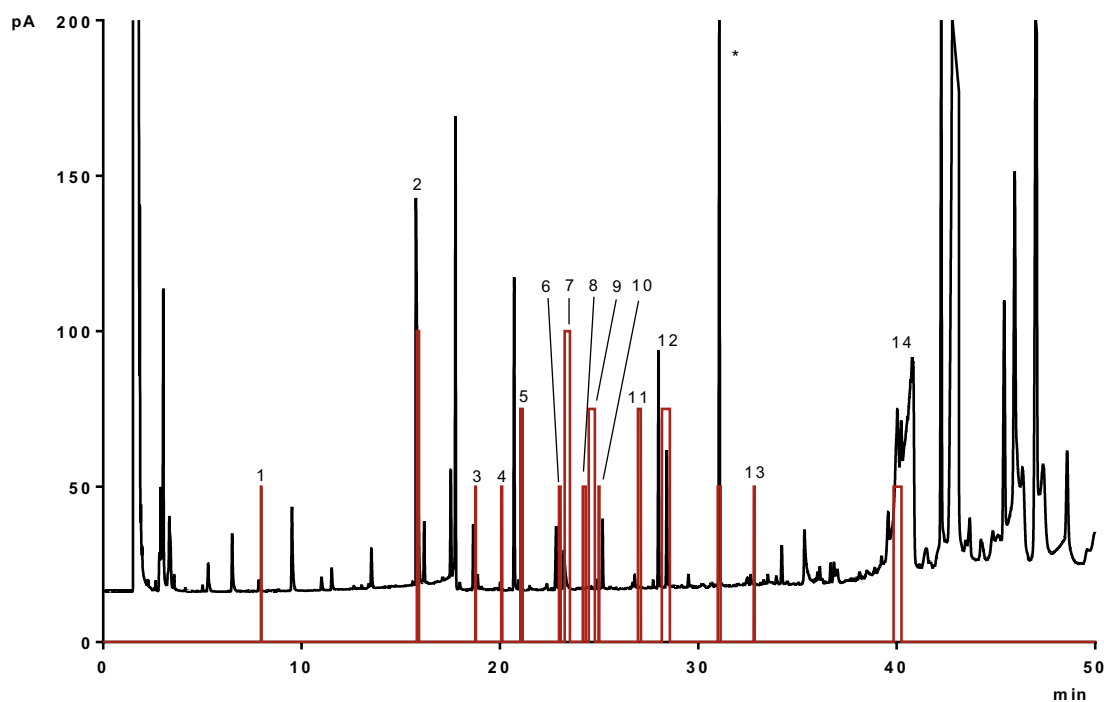


Abbildung 2.13: GC/FID/O-Chromatogramm der Biotransformation von lyophilisiertem Apfeltrester durch *T. chioneus* (TCH<sub>AT</sub>) mit FID- (schwarz) und ODP-Spur (rot); \* = Interner Standard

Tabelle 2.25: Übersicht über die olfaktorisch wahrgenommenen Substanzen nach Biotransformation von Apfeltrester durch *T. chioneus* (TCH<sub>AT</sub>; Kulturtag 4) zusammen mit dem flavor-dilution-Faktor (FD-Faktor), den zugehörigen Kováts-Indizes der Probe (KI), dem MS-Strukturvorschlag sowie dem Literaturgeruchseindruck

#	Geruchseindruck	FD-Faktor	KI GC/O HP- Innowax	KI GC/MS HP- Innowax	Struktur- vorschlag	Geruch Lit.
1	süßlich, fruchtig	2	912		n.b.	
2	Essig	64	1447	1465	Essigsäure	Essig <sup>1</sup>
3	Apfel, süßlich, fruchtig	4	1569	1531	Benzaldehyd	verbrannter Zucker, Mandel <sup>2</sup>
4	Käse	2	1630		n.b.	
5	muffig, Buttersäure	2	1673		n.b.	
6	süßlich, schwer, blumig	2	1760	1763	α-Farnesen	holzig <sup>3</sup>

#	Geruchseindruck	FD-Faktor	KI GC/O HP- Innowax	KI GC/MS HP- Innowax	Struktur- vorschlag	Geruch Lit.
7	süßlich, schwer, blumig, reifer Apfel, reife Pflaume, Trompetenbaum- blüte	128	1783	1791	3-Phenyl- propanal	grün, blumig <sup>4</sup>
8	herb, Teig, Brot, Wachs	8	1831		n.b.	
9	süßlich, Vanille, Zimt	32	1865	1889	Benzylalkohol	blumig, Trocken- früchte <sup>5</sup>
10	süßlich, Karamell, Zwiebel	2	1966		n.b.	
11	säuerlich, frisch, staubig	1	2030	2040	1H-Pyrrol- 2-carboxaldehyd	
12	süßlich, Karamell, Zimt	8	2052	2059	3-Phenyl- propanol	süß, blumig <sup>6</sup>
13	süßlich, Vanille, blumig	1	2279		n.b.	
14	süßlich, Wachs, Bienenwachs, Pollen	2	2686		n.b.	

n.b.: keine sichere Zuordnung möglich, <sup>1</sup>(Culleré *et al.* 2004), <sup>2</sup>(Valim *et al.* 2003), <sup>3</sup>(Chung *et al.* 1993), <sup>4</sup>(von Ranson und Belitz 1992), <sup>5</sup>(Fang und Qian 2005), <sup>6</sup>(Lee *et al.* 2008);

Mittels AEVA (5.2.9) wurden die jeweiligen FD-Faktoren für die Geruchseindrücke bestimmt und die Hauptaromakomponenten der Biotransformation von Apfeltrester durch *T. chioneus* ermittelt (Abbildung 2.14).

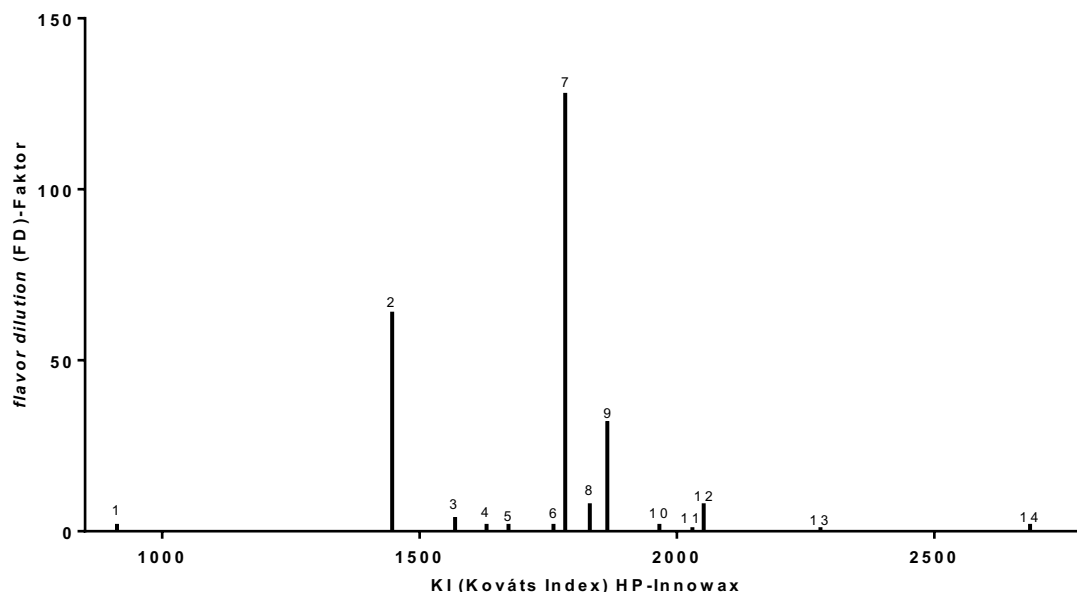


Abbildung 2.14: FD-Chromatogramm des durch flüssig/flüssig-Extraktion der Kultur der Biotransformation von Apfeltrester durch *T. chioneus* ( $TCH_{AT}$ ) erhaltenen Aromaextraktes

Sieben aromaaktive Substanzen wurden durch Vergleich der Massenspektren und ermittelten Kováts-Indizes mit denen authentischer Standards und Literaturdaten identifiziert (Tabelle 2.26; Anhang 7.1 und 7.3).

Tabelle 2.26: Mittels GC/MS identifizierte aromaaktive Substanzen aus der Biotransformation von lyophilisiertem Apfeltrester durch *T. chioneus* ( $TCH_{AT}$ ) mit Literaturvergleichswerten

Substanz	KI HP-Innowax			KI DB-5MS		
	GC/MS	Standard	Lit.	GC/MS	Standard	Lit.
Essigsäure	1464	1473	1477 <sup>1</sup>	<800	<800	660 <sup>7</sup>
Benzaldehyd	1531	1515	1500 <sup>2</sup>	964	964	965 <sup>2</sup>
$\alpha$ -Farnesen	1760	1746	1772 <sup>3</sup>	1509	1488	1518 <sup>2</sup>
3-Phenylpropanal	1783	1774	1723 <sup>4</sup>	1166	1166	1162 <sup>8</sup>
Benzylalkohol	1865	1889	1869 <sup>5</sup>	1087	1038	1036 <sup>9</sup>
1H-Pyrrol-2-carboxaldehyd	2030	2014	2036 <sup>6</sup>	1019	1018	1013 <sup>10</sup>
3-Phenylpropanol	2052	2034	2039 <sup>3</sup>	1235	1233	1232 <sup>11</sup>

<sup>1</sup>(Culleré *et al.* 2004), <sup>2</sup>(Chung *et al.* 1993), <sup>3</sup>(Mayorga *et al.* 2001), <sup>4</sup>(Fernandez *et al.* 2005), <sup>5</sup>(Komes *et al.* 2006), <sup>6</sup>(Yanagimoto *et al.* 2004), <sup>7</sup>(Krist *et al.* 2005), <sup>8</sup>(Buchin *et al.* 2002), <sup>9</sup>(Setzer *et al.* 2006), <sup>10</sup>(Kim *et al.* 2006), <sup>11</sup>(Shams-Ardakani *et al.* 2005)

Als Hauptaromakomponente wurde 3-Phenylpropanal (FD = 128) identifiziert. Maßgeblich zum Aroma trug zusätzlich Benzylalkohol (FD = 32) und 3-Phenylpropanol (FD = 8) bei. Die Gehalte der Hauptaromakomponenten und Biotransformationsprodukte wurden quantifiziert und die Aromawerte bestimmt (Tabelle 2.27).

Tabelle 2.27: Hauptaromakomponenten der Biotransformation von lyophilisiertem Apfeltrester durch *T. chioneus* ( $TCH_{AT}$ , Kulturtag 4) mit den Gehalten in der Kultur, den zugehörigen Geruchsschwellenwerten in Wasser und den Aromawerten (A)

Substanz	Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ Kultur] <sup>*</sup>	Geruchsschwellenwert in $\text{H}_2\text{O}$ [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ] <sup>*</sup>	A <sup>*</sup>
Essigsäure	7523	22000 <sup>1</sup>	<1
Benzaldehyd	160	35 <sup>2</sup>	5
3-Phenylpropanal	291	3	94
Benzylalkohol	96	6 <sup>2</sup>	17
3-Phenylpropanol	266	9	30

<sup>\*</sup>Werte auf ganze Zahlen gerundet, <sup>1</sup>(Rychlik *et al.* 1998), <sup>2</sup>(Yang *et al.* 2010)

Die Hauptaromakomponenten 3-Phenylpropanal (A: 94) und Benzylalkohol (A: 17) wurden durch die Aromawerte bestätigt. Essigsäure hatte keine Bedeutung für das Aroma (A: <1). Die Biotransformationsprodukt 3-Phenylpropanol (A: 30) sowie Benzaldehyd (A: 5) trugen maßgeblich zum Aroma der Biotransformation bei.

Um die Hauptaromakomponenten zu bestätigen, wurden diese in einem Aromamodell rekonstruiert. Die Rekonstruktion fand in der Matrix Pentan/Diethylether (Rekombinat Aromaextrakt  $TCH_{AT}$ ) im Vergleich zu den Aromaextrakten (Aromaextrakt  $TCH_{AT}$ ) statt. Des Weiteren wurde das Aromamodell in dem Referenzmedium M2 ohne Substratgabe (Rekombinat  $TCH_{AT}$ ) im Vergleich zum Kulturmedium von *T. chioneus* mit Apfeltrester nach vier Kulturtagen ( $TCH_{AT}$ ) durchgeführt. Die Geruchseindrücke der olfaktorischen Evaluierung des Panels sind in Tabelle 2.28 dargestellt.

Tabelle 2.28: Gesamtgeruchseindruck der Extrakte und des Kulturmediums der Biotransformationen von lyophilisiertem Apfeltrester durch *T. chioneus* ( $TCH_{AT}$ , Kulturtag 4) und den zugehörigen Aromamodellen in der Matrix Pentan/Diethylether (1/1,12 v/v) und Referenzmedium M2 ohne Substratgabe

Probe	Geruchseindruck	Intensität
Aromaextrakt $TCH_{AT}$	süß, schwer, Most, Honig, Rosinen, würzig	5/5
Rekombinat Aromaextrakt $TCH_{AT}$	süßlich, schwer, Honig, Pollen, Zimt	3/5
$TCH_{AT}$	süßlich, fruchtig, Kompott, Pflaume, Pflaumenmus	5/5
Rekombinat $TCH_{AT}$	süßlich, fruchtig, Orangensaft	2-3/5

#### 2.1.6.2 Bildung flüchtiger Verbindungen im Kulturverlauf von *T. chioneus* mit lyophilisiertem Apfeltrester

Um die Bildung der Aromastoffe im Kulturverlauf (Tag 0-8) zu ermitteln, wurden jeden Tag Proben der Kultivierung von *T. chioneus* mit lyophilisiertem Apfeltrester entnommen, mittels HS-SPME extrahiert und gaschromatographisch-massenspektrometrisch analysiert (5.2.8.2). Die flüchtigen Verbindungen wurden durch den Vergleich der Massenspektren und ermittelten Kováts-Indizes der Probe mit Literaturdaten identifiziert (5.2.8.1; Anhang 7.1 und 7.3). Die Aromastoffe, deren Peakflächen sich im Kulturverlauf maßgeblich veränderten, wurden näher untersucht (Abbildung 2.15). Die Substratblindwerte  $AT_{BW}$  und die Pilzblindwerte  $TCH_{BW}$  wurden im Kulturverlauf (Tag 0-8) analysiert (Anhang 7.1 und 7.3; Abbildung 7.73).

Im Kulturverlauf wurden Furfural, Methyl-2-furoat und Oct-1-en-3-ol gebildet.  $\alpha$ -Farnesen wurde im Kulturverlauf abgebaut. Im ersten Drittel der Kultivierungsdauer wurde eine Bildung von  $\beta$ -Damascon gezeigt. Zusätzlich wurden Dihydropseudoionon und Linalool im Kulturverlauf gebildet.  $\beta$ -Ionon hingegen wurde innerhalb der ersten Tage abgebaut. Im Kulturverlauf wurde Benzaldehyd abgebaut und parallel 3-Phenylpropanal gebildet, welches die höchsten Gehalte an Tag sechs aufwies. Ab dem Tag drei wurden zusätzlich Phenyllessigsäuremethylester und Hydrozimtsäuremethylester, ab dem Tag vier Zimtaldehyd und ab dem Tag fünf 3-Phenylpropanol und Benzylalkohol gebildet. Zimtsäuremethylester wurde ab dem Tag sieben nachgewiesen.



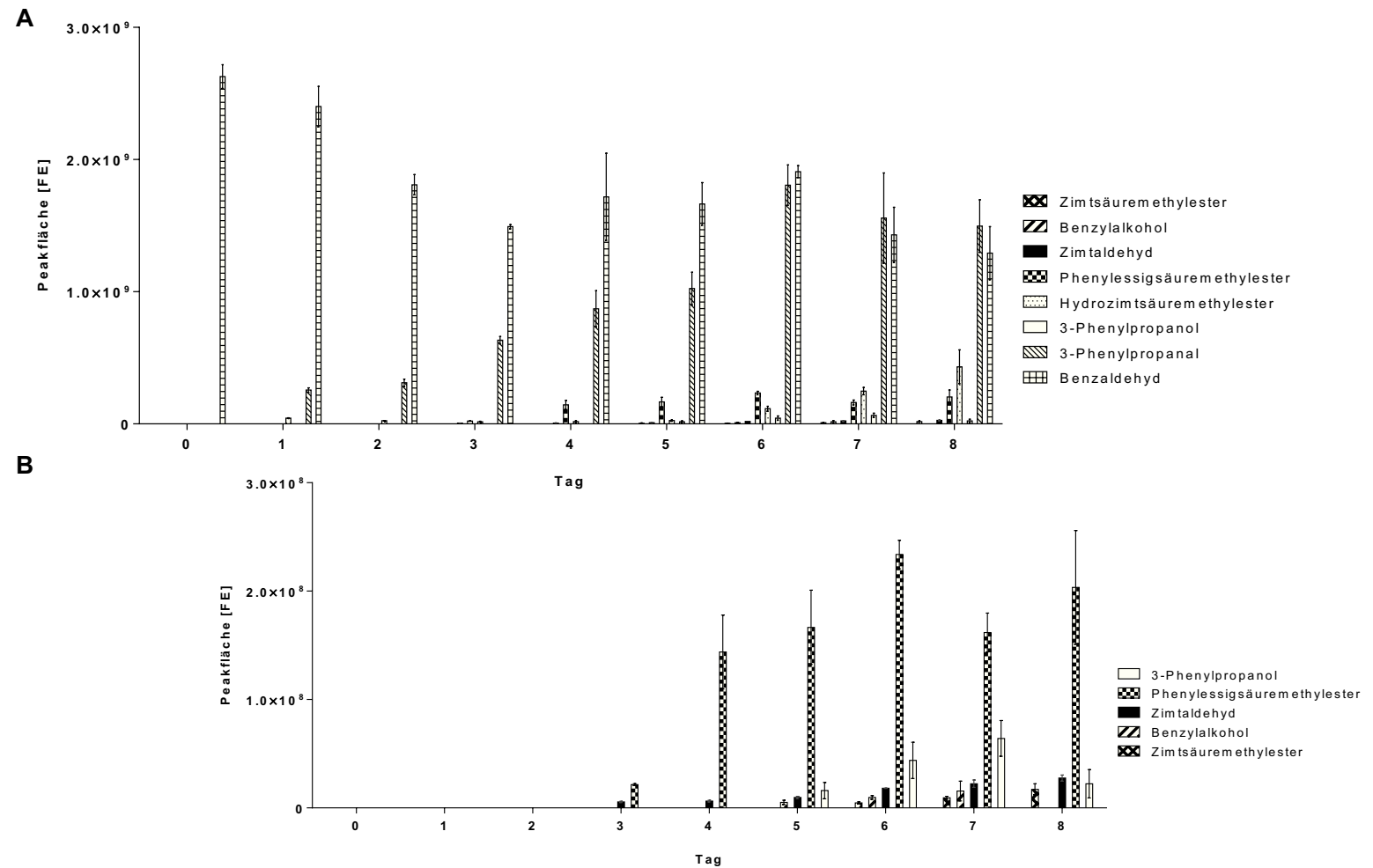


Abbildung 2.15: Bildung von benzoiden und phenylpropanoiden Verbindungen im Kulturverlauf (Tag 0-8) von *T. chioneus* mit lyophilisiertem Apfeltrester (A); das Insert (B) zeigt die Bildung der Verbindungen, die Peakflächen von maximal  $3 \times 10^8$  aufwiesen

### 2.1.6.3 Optimierung der Medien – Biotransformation von Apfeltrester durch *T. chioneus*

Der Einfluss einer verringerten Gabe einzelner Medienbestandteile auf die Aromastoffgenese wurde bei der Kultivierung von *T. chioneus* mit dem Substrat Apfeltrester (TCH<sub>AT</sub>) untersucht (Tabelle 2.29). Um die Bildung der Biotransformationsprodukte zu steigern, wurde dem Medium Glucose-Monohydrat (M11) zugesetzt. Zusätzlich wurden die chemisch definierten Stickstoffquellen Asparaginsäure und Ammoniumnitrat durch komplexe Stickstoffquellen ersetzt (Hefeextrakt, Sojapepton und Casein-Hydrolysat).

*Tabelle 2.29: Geruchseindrücke der Biotransformationen in modifizierten Medien nach vier Kulturtagen; zur Zusammensetzung der Medien siehe Tabelle 5.7*

Stamm/Substrat-Kombination	Medium	Kulturtag [d]	sensorischer Gesamteindruck
TCH <sub>AT</sub>	M3	4	Pflaume, säuerlich, dumpf, staubig
TCH <sub>AT</sub>	M5	4	süßlich, schwer, Honig, Blüten
TCH <sub>ATu</sub>	M4	4	fruchtig, Honig, Rauch
TCH <sub>ATu</sub>	M5	4	süßlich, schwer, Honig, Blüten
TCH <sub>ATu</sub>	M10	4	fruchtig, überreife Früchte, Pflaume, Rauch
TCH <sub>ATu</sub>	M11	4	schwer, blumig, Kompott, überreife Früchte, dumpf
TCH <sub>ATu</sub>	M12	4	frische Pflaume, süßlich
TCH <sub>ATu</sub>	M13	4	fruchtig, süßlich, frisch
TCH <sub>ATu</sub>	M15	4	süßlich, Pflaume
TCH <sub>ATu</sub>	M16	4	Rauch, würzig, Maggi

Im Vergleich zur Biotransformation von Apfeltrester (AT) im Referenzmedium (M2) führte der Verzicht auf den Zusatz der Spurenelementlösung (Medium M3) zu einer geringeren Bildung von 3-Phenylpropanal und Phenylelessigsäuremethylester. 3-Phenylpropanol, und Benzylalkohol wurden hingegen vermehrt gebildet (Abbildung 2.16).

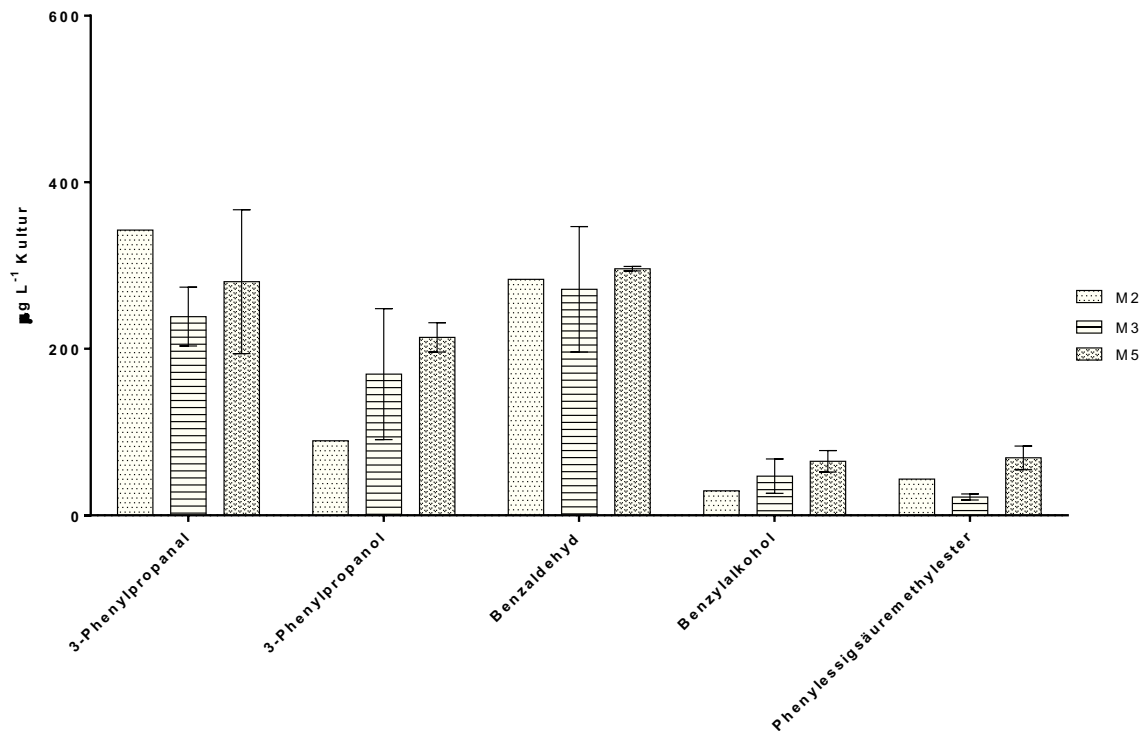


Abbildung 2.16: Gehalte ausgewählter Biotransformationsprodukte nach Fermentation von Apfeltrester durch *T. chioneus* ( $TCH_{AT}$ ) ohne Spurenelementlösung, und Stickstoffquelle (Medien M3 und M5) im Vergleich zum Referenzmedium (M2)

Insgesamt wurden im Medium (M3) die geringsten Gehalte an Biotransformationsprodukten ermittelt. Der Gesamtgeruchseindruck wurde als säuerlich und dumpf wahrgenommen. Der Zusatz der Spurenelementlösung war somit zur Entstehung des attraktiven Gesamtgeruchseindrucks notwendig. Wurde dem Medium keine zusätzliche Stickstoffquelle zugesetzt (Medium M5) wurden erneut geringere Mengen an 3-Phenylpropanal gebildet. 3-Phenylpropanol, Benzylalkohol und Phenyllessigsäuremethylester wurden hingegen vermehrt nachgewiesen. Die höheren Gehalte an Phenyllessigsäuremethylester spiegeln sich im Gesamtgeruchseindruck wider, der an Honig und Blüten erinnerte.

Die Kultivierung von *T. chioneus* mit unbehandeltem (ohne Gefriertrocknungsschritt) Apfeltrester ( $TCH_{ATu}$ ) ohne zusätzliche Stickstoffquelle (Medium M5) lieferte verringerte Mengen an 3-Phenylpropanal (Abbildung 2.17).

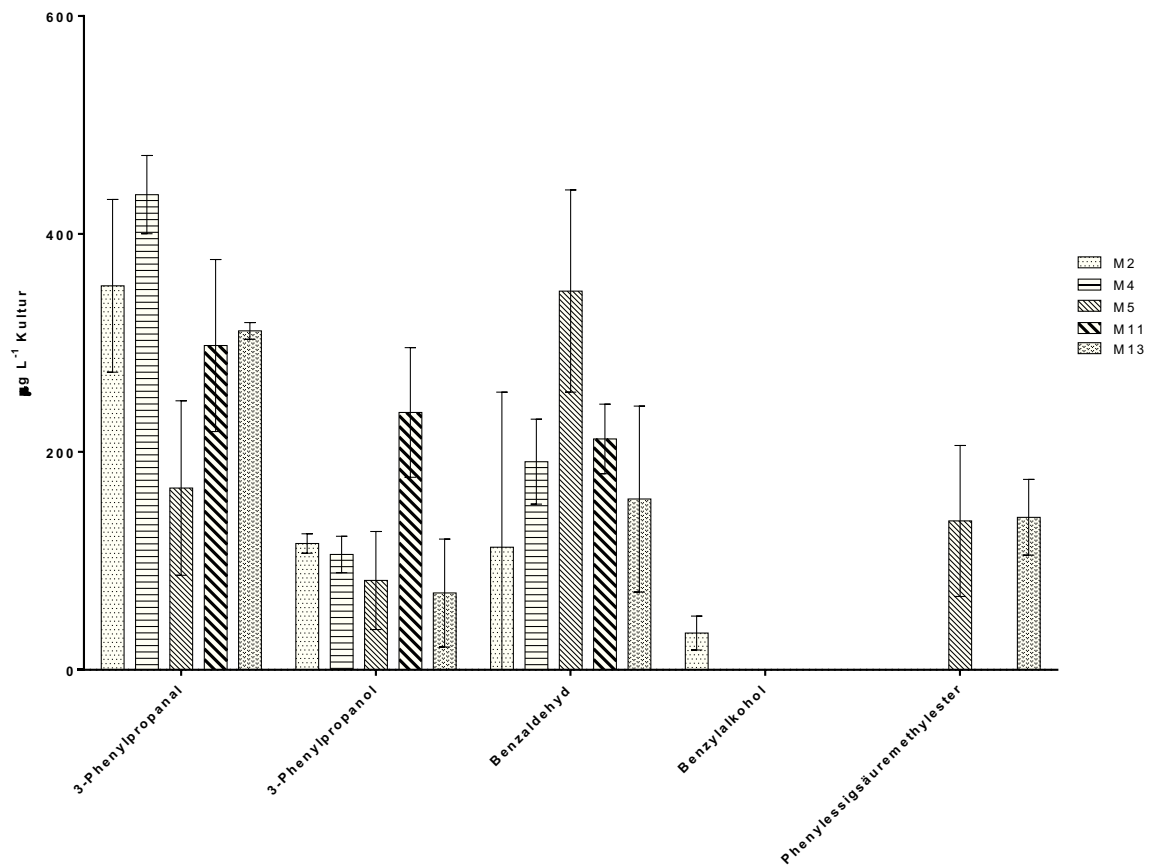


Abbildung 2.17: Gehalte ausgewählter Biotransformationsprodukte nach Fermentation von unbehandeltem Apfeltrester durch *T. chioneus* ( $\text{TCH}_{\text{AT}_u}$ ) ohne Vitaminlösung bzw. Stickstoffquelle (Medien M4 und M5), sowie mit zusätzlicher Glucosegabe (Medium M11) und ohne zusätzliche Stickstoffquellen bei gleichzeitiger Halbierung der Spurenelement- und Vitaminkonzentration (Medium M13) im Vergleich zum Referenzmedium (M2)

In dieser Kultur wurde ebenfalls Phenyllessigsäuremethylester nachgewiesen. Dies spiegelte sich erneut in der Honignote des Gesamtgeruchseindrucks wider. Die Biotransformation von unbehandeltem Apfeltrester durch *T. chioneus* ( $\text{TCH}_{\text{AT}_u}$ ) ohne Vitaminzusatz (Medium M4) wies eine Rauchnote auf, die nicht mit der Referenz (Medium M2) vergleichbar war. Die Hauptaromakomponente 3-Phenylpropanal wurde in geringfügig höheren Konzentrationen nachgewiesen. Der Zusatz der Vitaminlösung war ebenfalls erforderlich. Der Zusatz von Glucose als zusätzliche Kohlenstoffquelle (Medium M11) resultierte in einer als dumpf wahrgenommenen Kultur. Der Verzicht auf zusätzliche Stickstoffquellen bei gleichzeitiger Halbierung der Spurenelement- und Vitaminkonzentration ( $\text{AT}_u$ , Medium M13) führte zwar zu fruchtigen, frischen Kulturen, die aber ihren typischen pflaumenartigen Geruch verloren.

Der Austausch der definierten Stickstoffquelle (Ammoniumnitrat bzw. Asparaginsäure) gegen eine komplexe Stickstoffquelle führte bei der Verwendung von Hefeextrakt (Medium M12) bei der Biotransformation von unbehandeltem Apfeltrester (AT<sub>u</sub>) zu einem sehr angenehmen und intensiven Geruchseindruck nach Pflaume und Frucht. Hierbei verringerte sich die Menge an 3-Phenylpropanal (Abbildung 2.18).

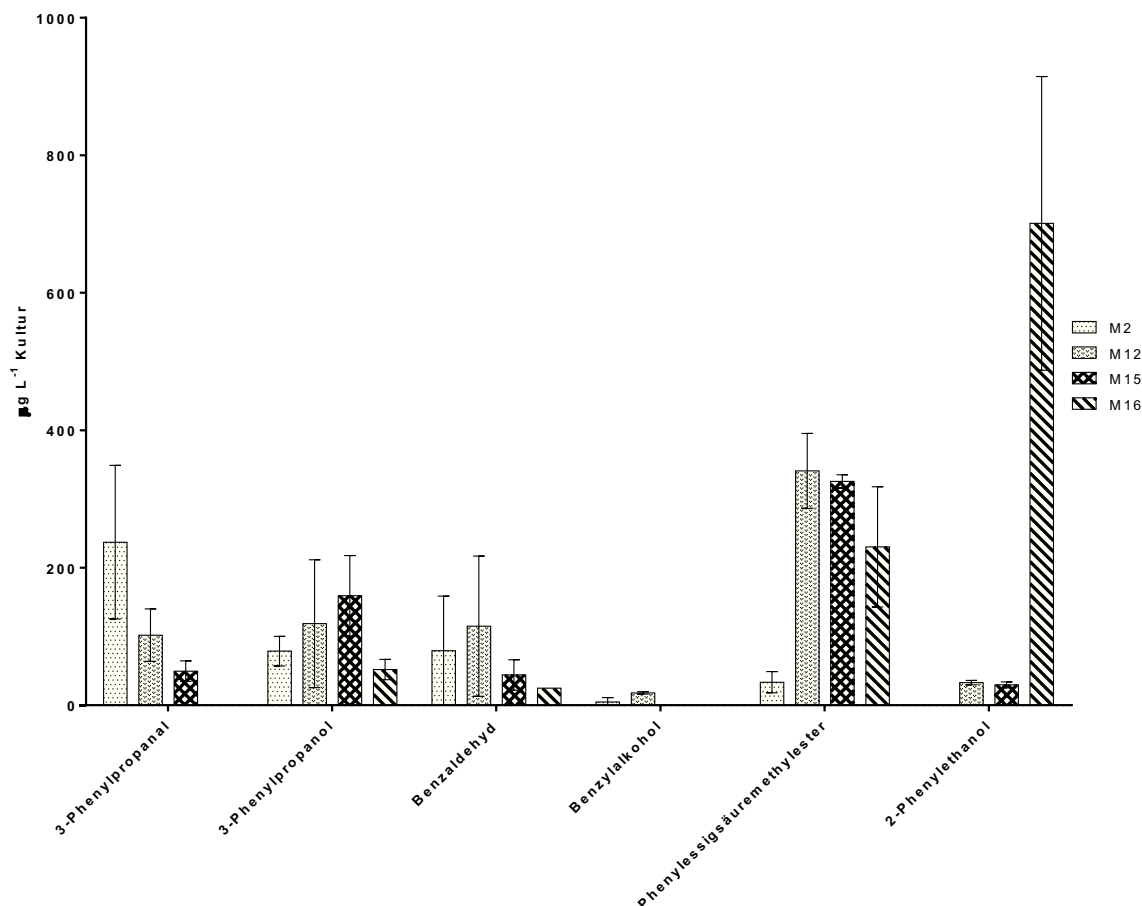


Abbildung 2.18: Gehalte ausgewählter Biotransformationsprodukte nach Fermentation von unbehandeltem Apfeltrester durch *T. chioneus* (TCH<sub>AT<sub>u</sub></sub>) mit komplexen Stickstoffquellen Hefeextrakt, Sojapepton und Casein-Hydrolysat (Medien M12, M15 und M16) im Vergleich zum Referenzmedium (M2)

Parallel wurden 3-Phenylpropanol, Benzylalkohol, Phenyllessigsäuremethylester und 2-Phenylethanol gebildet. Die Verwendung von Sojapepton (AT<sub>u</sub>, Medium M15) führte zu fruchtigen, pflaumenartigen Kulturen, die aber von einzelnen Probanden als unangenehm wahrgenommen wurden. Die Verwendung von Casein-Hydrolysat (AT<sub>u</sub>, Medium M16) resultierte in würzig riechenden Kulturen, die der Referenz (Medium M2) nicht ähnelten.

#### **2.1.6.4 Dotierung der Biotransformation von Apfeltrester durch *T. chioneus* mit möglichen Vorstufen der Biotransformationsprodukte**

Um den Einfluss von möglichen Präkursoren der Biotransformationen auf die erfassten Aromastoffe zu untersuchen, wurden dem Medium die Aminosäuren L-Phenylalanin, L-Tyrosin und L-Asparagin (M14, M19 und M20; 0; 10 mM) sowie Benzaldehyd, Farnesen, Kaffeesäure, *p*-Cumarsäure, Chlorogensäure und Zimtsäure (M17-18, M21-24, 0; 1 mM) zugesetzt. Als Referenz diente die Kultivierung im Medium M2. Nach erfolgter Biotransformation wurden die Kulturen flüssig/flüssig extrahiert und gaschromatographisch analysiert (5.2.8; Anhang 7.1 und 7.3).

Die Dotierung mit L-Phe und L-Asn resultierte nicht in einer vermehrten Bildung der Hauptaromakomponenten 3-Phenylpropanal, 3-Phenylpropanol und Benzylalkohol. Bei der Dotierung mit L-Phe wurde hingegen Phenylelessigsäuremethylester verstärkt gebildet (Faktor 48). Zusätzlich wurde die Bildung von Phenylelessigsäure und 2-Phenylethanol beobachtet. Die Dotierung mit L-Tyr führte zu keiner vermehrten Bildung der Biotransformationsprodukte.

Die Zugabe von Benzaldehyd führte zu keiner vermehrten Genese der Biotransformationsprodukte. Zusätzlich wurde 2-Hydroxybenzaldehyd, 2-Phenylethanol, Zimtaldehyd und Benzoessäure nachgewiesen. Die Dotierung mit Farnesen hingegen führte zu einer geringfügig vermehrten Bildung von 3-Phenylpropanol (Abbildung 2.19). Zusätzlich wurde 3-Hydroxybutan-2-on, 6-Methyl-5-hepten-2-on,  $\tau$ -Cadinol, und  $\alpha$ -Bisabolol identifiziert.

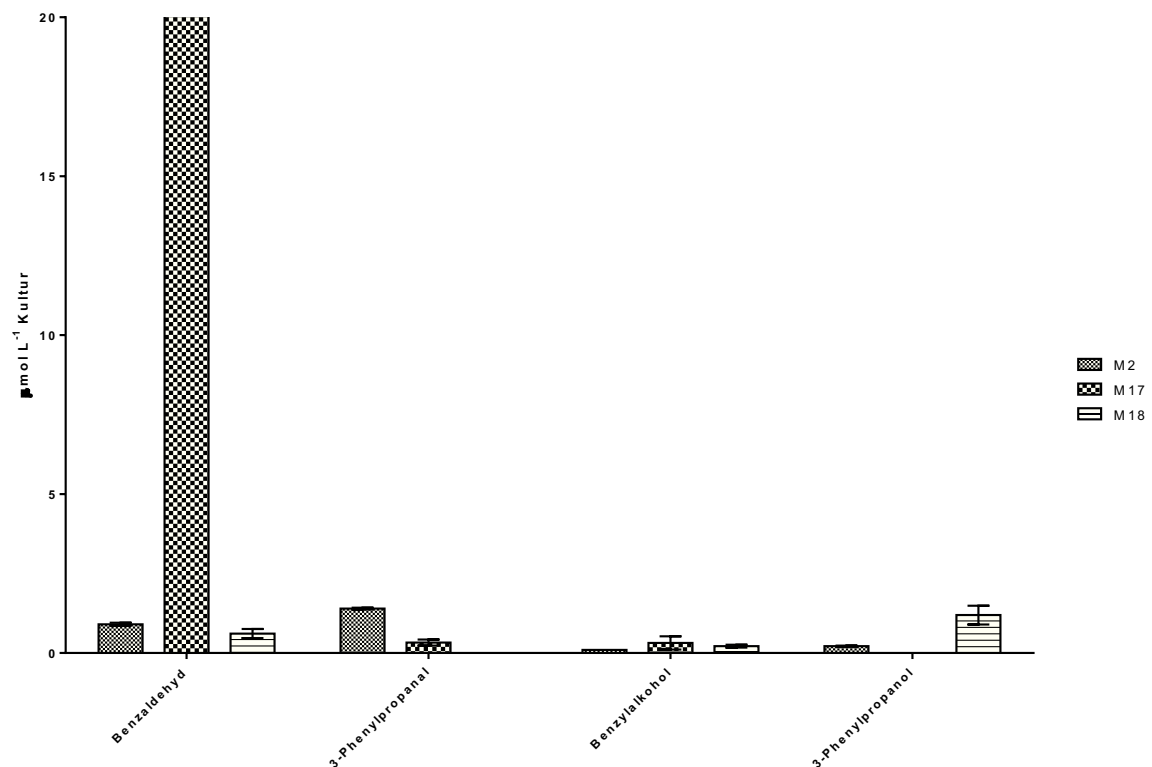


Abbildung 2.19: Gehalte ausgewählter Biotransformationsprodukte nach Biotransformation von Apfeltrester durch *T. chioneus* ( $TCH_{AT}$ ) unter Dotierung mit Benzaldehyd und Farnesen (Medium M17 und M18) im Vergleich zum Referenzmedium ohne Zusatz (M2)

Die Dotierung mit den phenolischen Säuren Kaffeesäure, Chlorogensäure und *p*-Cumarsäure führte zu keiner vermehrten Bildung von Biotransformationsprodukten. Lediglich die Zugabe von Kaffeesäure führte zu einer geringfügig gesteigerten Produktion von 3-Phenylpropanol. Die Zugabe von Zimtsäure hingegen resultierte in einer zehnfach höheren Bildung von 3-Phenylpropanal und 3-Phenylpropanol (Abbildung 2.20). Der Unterschied in der Bildung von 3-Phenylpropanal zwischen dem Referenzmedium (M2) und der mit 1 mM Zimtsäure dotierten Kultur war signifikant. Zusätzlich wurden 2-Phenylethanol, Maltol und Zimtaldehyd in den mit Zimtsäure dotierten Kulturen nachgewiesen.

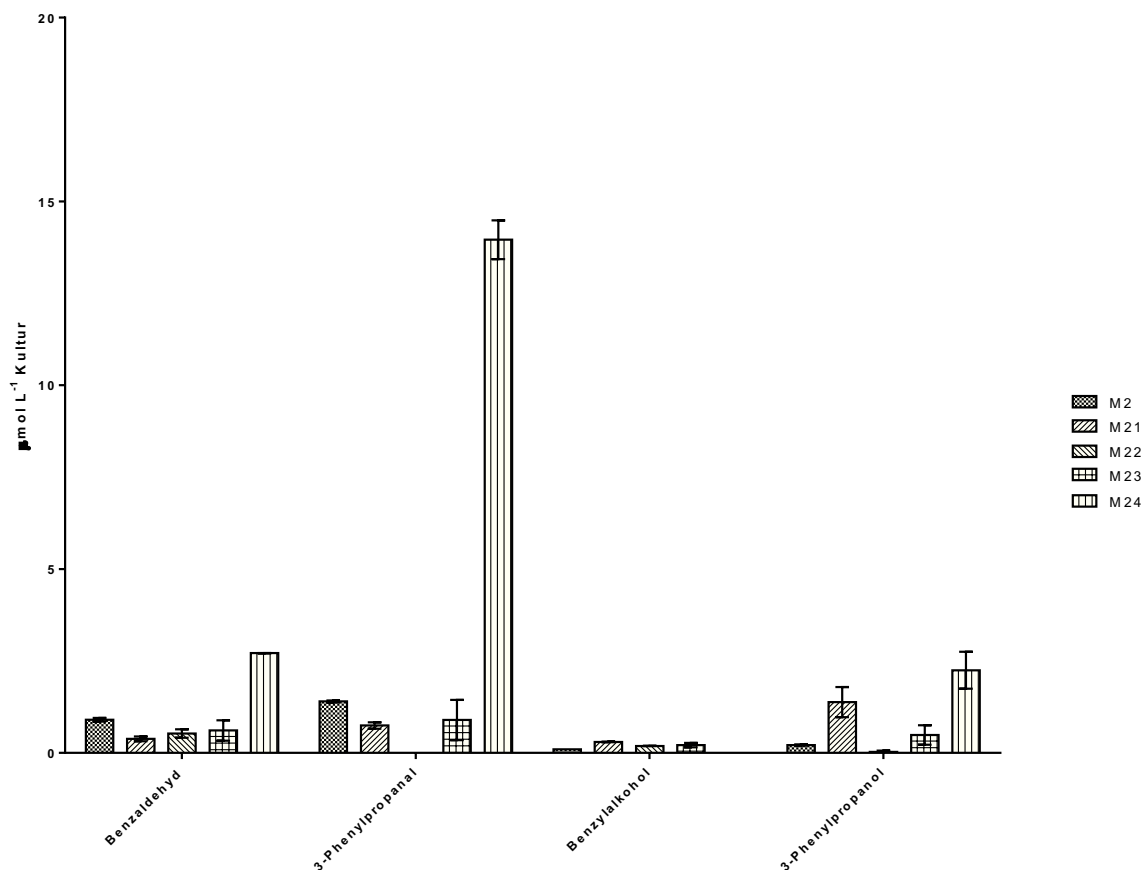


Abbildung 2.20: Gehalte ausgewählter Biotransformationsprodukte nach Fermentation von Apfeltrester durch *T. chioneus* ( $TCH_{A7}$ ) unter Dotierung mit Kaffeesäure, p-Cumarsäure, Chlorogensäure und Zimtsäure (Medium M21-24) im Vergleich zum Referenzmedium ohne Zusatz einer phenolischen Säure (M2)

#### 2.1.6.5 Einsatz von markierter (*E*)-Zimtsäure als Präkursor für die Bildung der Biotransformationsprodukte 3-Phenylpropanal, Zimtaldehyd und 3-Phenylpropanol durch *T. chioneus*

Um den Präkursor (*E*)-Zimtsäure zu bestätigen sowie die Biogenesewege von Zimtaldehyd, 3-Phenylpropanal und 3-Phenylpropanol zu untersuchen, wurde (*E*)-D<sub>7</sub>-Zimtsäure direkt in das Referenzmedium supplementiert (Dreifachbestimmung mit einem Mediumvolumen von 40 mL; Maßstab 0,4:1; 5.2.5.3). Die Biotransformation wurde flüssig/flüssig extrahiert (5.2.5.3) und gaschromatographisch-massenspektrometrisch analysiert (5.2.8.1; Abbildung 2.21).



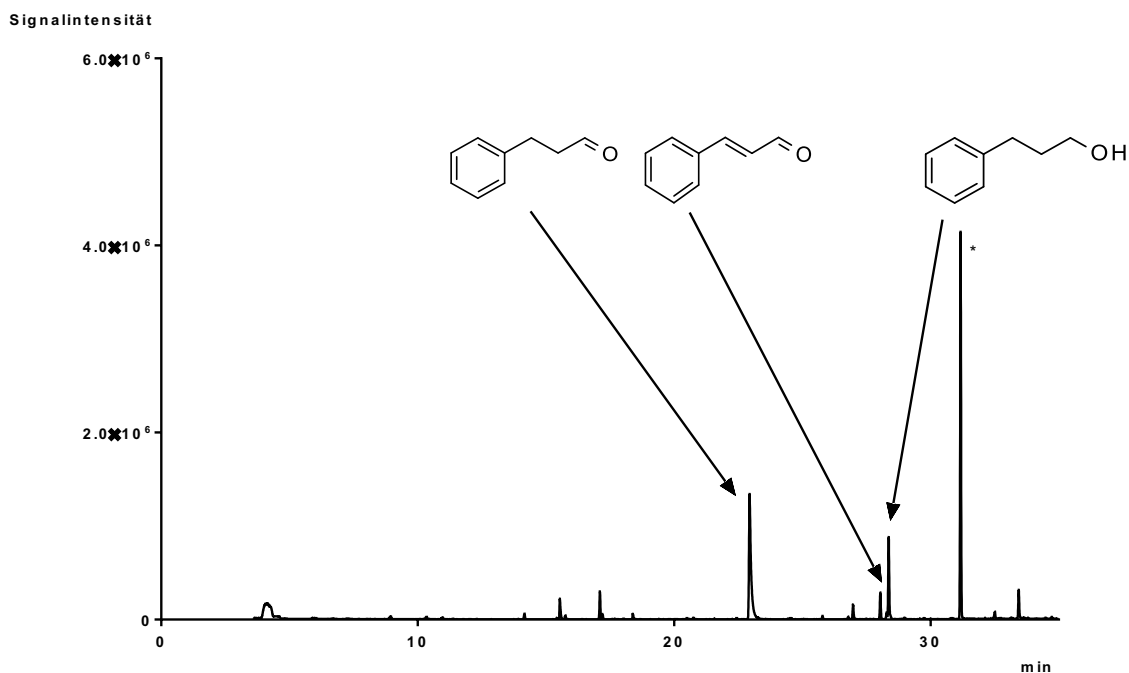


Abbildung 2.21: GC/MS-Chromatogramm der Kultivierung von *T. chioneus* mit Apfeltrester nach Zusatz von (*E*)-D<sub>7</sub>-Zimtsäure (1 mM); \* = Interner Standard

Das Massenspektrum von 3-Phenylpropanal, nach Zusatz von (*E*)-D<sub>7</sub>-Zimtsäure als Präkursor in die Kultivierung von *T. chioneus* mit Apfeltrester (Medium M25; Abbildung 2.22), zeigte einen intensiven Molekülionenpeak M<sup>+</sup> bei m/z 140 und 141. Der authentische Standard besaß im Kontrast dazu ein Molekülion M<sup>+</sup> bei m/z 134. Um den Markierungsgrad zu bestimmen, wird der Molekülionen- oder der Quasimolekülionenpeak verwendet. Das Verhältnis des unmarkierten Analyten A (m/z 134) zum markierten Analyten A<sup>d<sub>6</sub> & d<sub>7</sub></sup> (m/z 140 und 141) bezogen auf die Intensität war 40/752. Dies entsprach einem Anteil an markiertem 3-Phenylpropanal von 95%. Somit handelte es sich bei der (*E*)-D<sub>7</sub>-Zimtsäure um die Vorstufe des 3-Phenylpropanals.

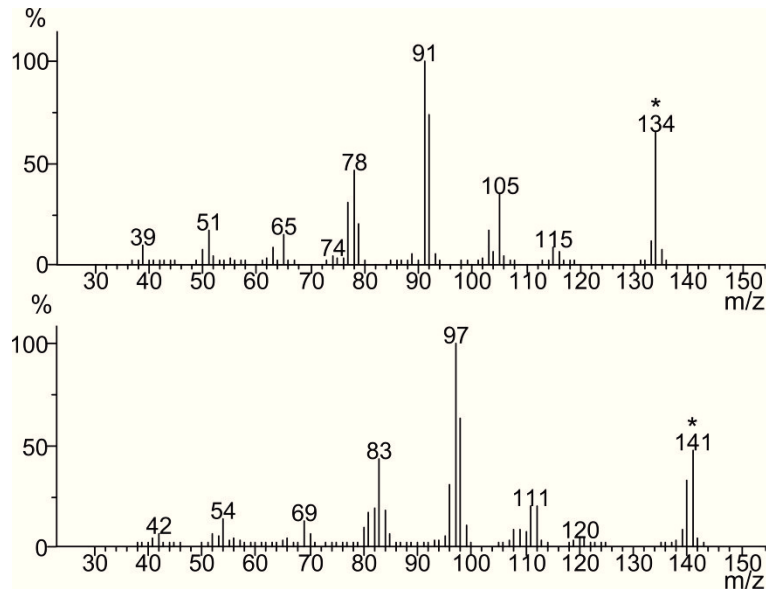


Abbildung 2.22: Massenspektrum von 3-Phenylpropanal nach Zusatz von (E)-D<sub>7</sub>-Zimtsäure (1 mM) als Präkursor in die Kultivierung von *T. chioneus* mit Apfeltrester (unten) im Vergleich zum Massenspektrum des authentischen Standards von 3-Phenylpropanal (oben); \* = Molekülion

Das Massenspektrum von Zimtaldehyd, nach Zusatz von (E)-D<sub>7</sub>-Zimtsäure als Präkursor in die Kultivierung von *T. chioneus* mit Apfeltrester (Medium M25; Abbildung 2.23), wies einen intensiven Molekülionenpeak M<sup>+</sup> bei m/z 138 und 139 (authentischer Standard Zimtaldehyd M<sup>+</sup> = m/z 132) auf. Das Verhältnis des unmarkierten Analyten A (m/z 132) zum markierten Analyten A<sup>d6</sup> & d<sup>7</sup> (m/z 138 und 139) bezogen auf die Intensität betrug 0/1348, welches einem Anteil an markiertem Zimtaldehyd von 100% entsprach. (E)-D<sub>7</sub>-Zimtsäure war der Präkursor des Zimtaldehyds.

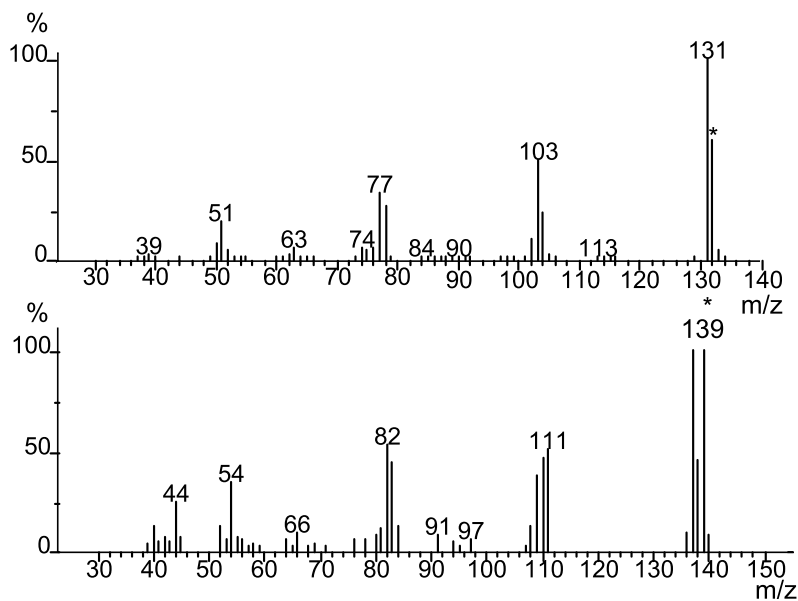


Abbildung 2.23: Massenspektrum von Zimtaldehyd nach Zusatz von (E)-D<sub>7</sub>-Zimtsäure (1 mM) als Präkursor in die Kultivierung von *T. chioneus* mit Apfeltrester (unten) im Vergleich zum Massenspektrum des authentischen Standards von Zimtaldehyd (oben); \* = Molekülion

Das Massenspektrum von 3-Phenylpropanols, nach Zusatz von (*E*)-D<sub>7</sub>-Zimtsäure als Präkursor in die Kultivierung von *T. chioneus* mit Apfeltrester (Medium M25; Abbildung 2.24), wies einen intensiven Molekülionenpeak M<sup>+</sup> bei 142 und 143 (authentischer Standard 3-Phenylpropanol M<sup>+</sup> = m/z 136) auf. Das Verhältnis des unmarkierten Analyten A (m/z 136) zum markierten Analyten A<sup>d6</sup> & d<sup>7</sup> (m/z 142 und 143) bezogen auf die Intensität betrug 5/294, welches einem Anteil an markiertem 3-Phenylpropanol von 98% entsprach. (*E*)-D<sub>7</sub>-Zimtsäure stellte die Vorstufe des 3-Phenylpropanols dar.

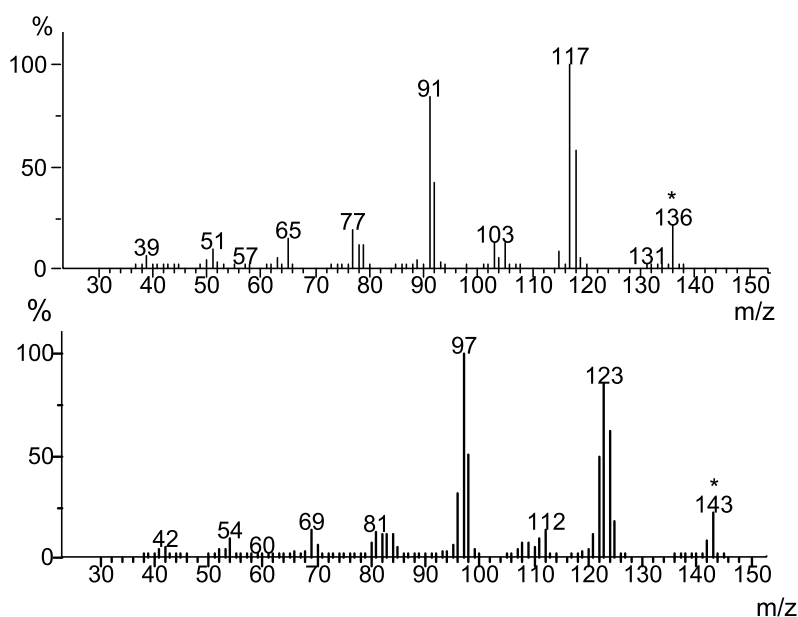


Abbildung 2.24: Massenspektrum von 3-Phenylpropanol nach Zusatz von (*E*)-D<sub>7</sub>-Zimtsäure (1 mM) als Präkursor in die Kultivierung von *T. chioneus* mit Apfeltrester (unten) im Vergleich zum Massenspektrum des authentischen Standards von 3-Phenylpropanol (oben);  
\* = Molekülionenpeak

#### 2.1.6.6 Maßstabsvergrößerung der Biotransformation von Apfeltrester durch *T. chioneus*

Eine Maßstabsvergrößerung der Biotransformation von unbehandeltem Apfeltrester durch *T. chioneus* wurde um den Faktor 40 (4 L Medium M2) in einem 7,5-L-Fermenter (Labfors 3d, Infors AG) etabliert (5.2.5.4, Abbildung 2.25). Nach erfolgter Biotransformation des Tresters wurde ein Aliquot der Kulturbrühe olfaktorisch evaluiert, im Weiteren flüssig/flüssig extrahiert und gaschromatographisch analysiert (5.2.8.1).



Abbildung 2.25: Fermenter mit der Biotransformation von unbehandeltem Apfeltrester durch *T. chioneus* in 4 L Medium M2 (Maßstab 4:1; Kulturtag 4)

Der olfaktorische Gesamteindruck der Referenzkultur in 100 mL Medium M2 (Maßstab 1:1) und der Maßstabvergrößerungen mit einem Mediumvolumen von 400 mL und 4 L (4:1 und 40:1) waren nach Evaluierung im Panel (5.2.6) kongruent (Tabelle 2.30).

Tabelle 2.30: Geruchseindrücke der Biotransformation von unbehandeltem Apfeltrester durch *T. chioneus* in 400 mL Medium (4:1) und 4L Medium (40:1) im Vergleich zu der Referenzkultur in 100 mL Medium (1:1)

Stamm/Substrat-Kombination	sensorischer Gesamteindruck
TCH <sub>ATu</sub> 1:1	frisch, Pflaumenmus, fruchtig
TCH <sub>ATu</sub> 4:1	frisch, Pflaumenmus, fruchtig
TCH <sub>ATu</sub> 40:1	süßlich, frisch, Pflaumenmus, fruchtig

Im Aromaextrakt der Biotransformation in 4 L Medium M2 wurden 16 flüchtige Verbindungen mittels GC/MS identifiziert (Abbildung 2.26; Tabelle 2.31; Anhang 7.1 und 7.3).

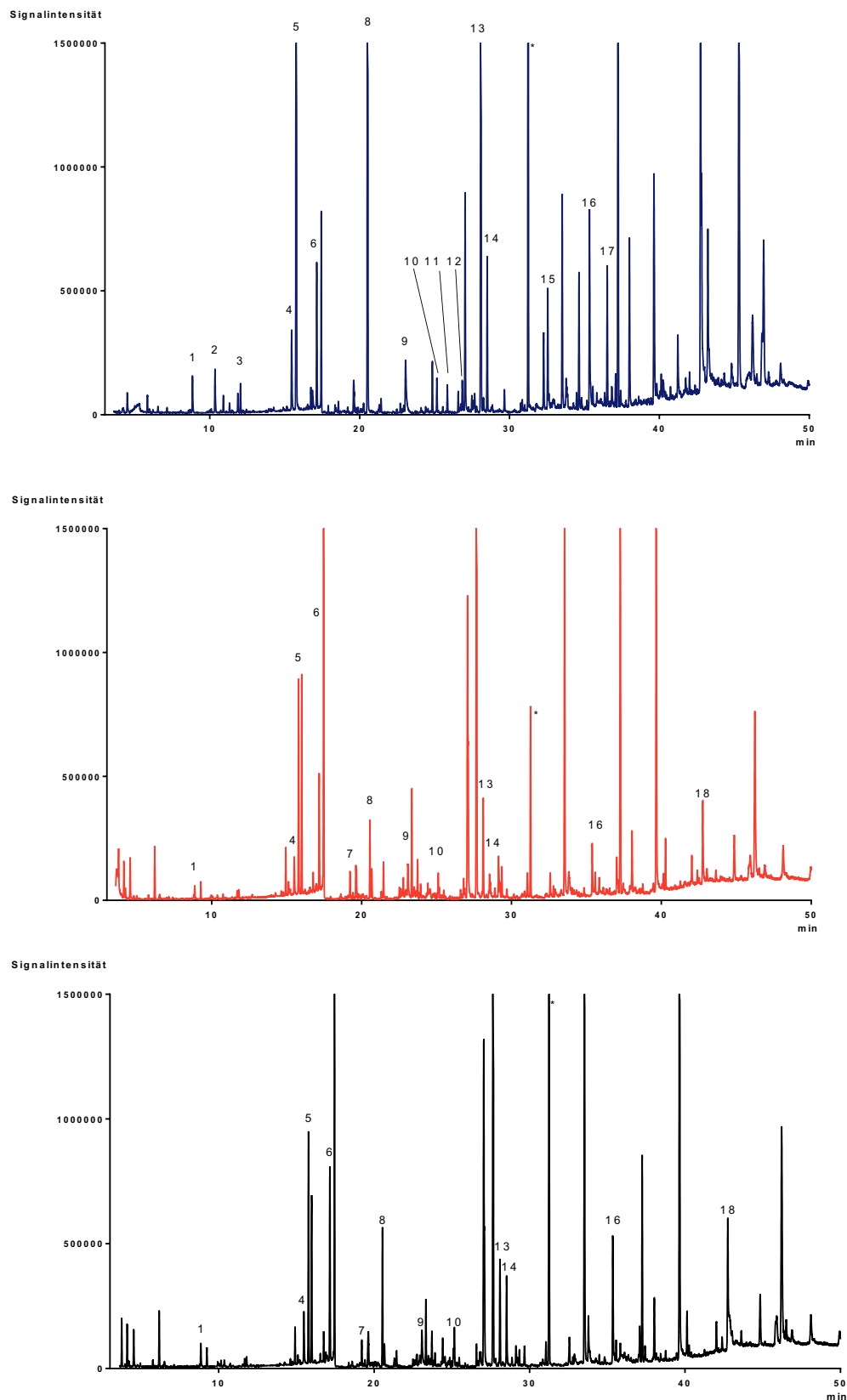


Abbildung 2.26: GC/MS-Chromatogramme der flüssig/flüssig-Extraktion der Kultivierung von *T. chioneus* mit unbehandeltem Apfeltrester ( $TCH_{ATu}$ , Kulturtag 4) in 100 mL Medium M2 (1:1; schwarz), 400 mL Medium M2 (4:1; rot) und 4 L Medium M2 (40:1; blau)

Tabelle 2.31: Mittels GC/MS ermittelte flüchtige Verbindungen der Kultivierung von *T. chioneus* mit unbehandeltem Apfeltrester ( $TCH_{ATu}$ , Kulturabbruch Tag 4) in 100 mL Medium M2 (1:1), 400 mL Medium M2 (4:1) und 4 L Medium M2 (40:1) und den dazugehörigen Literaturwerten

#	MS-Vorschlag	KI Lit.	KI Probe 100 mL Medium HP-Innowax	KI Probe 400 mL Medium HP-Innowax	KI Probe 4 L Medium HP-Innowax
1	2-Methylbutan-1-ol	1205 <sup>1</sup>	1200	1200	1200
2	Methylpyrazin	1251 <sup>2</sup>			1258
3	2,6-Dimethylpyrazin	1312 <sup>2</sup>			1318
4	Essigsäure	1477 <sup>3</sup>	1449	1450	1448
5	Furfural	1467 <sup>3</sup>	1460	1461	1460
6	Benzaldehyd	1500 <sup>4</sup>	1513	1514	1513
7	Hexadecan	1600 <sup>4</sup>	1597	1598	
8	2-Furanmethanol	1669 <sup>5</sup>	1656	1657	1656
9	3-Phenylpropanal	1723 <sup>6</sup>	1769	1770	1768
10	Benzylalkohol	1869 <sup>7</sup>	1867	1868	1866
11	2-Phenylethanol	1916 <sup>8</sup>			1899
12	Maltol	1961 <sup>9</sup>			1949
13	1-H-Pyrrol- 2-carboxaldehyd	2036 <sup>10</sup>	2011	2012	2011
14	3-Phenylpropanol	2039 <sup>11</sup>	2034	2035	2033
15	2,3-Dihydro-3,5-di- hydroxy-6-methyl- 4H-pyran-4-on	2211 <sup>12</sup>			2251
16	Benzoessäure	2400 <sup>13</sup>	2414	2415	2413
17	5-Hydroxymethyl- furfural	2502 <sup>14</sup>			2485
18	n-Hexadecansäure	2940 <sup>4</sup>	n.b.	n.b.	

n.b.: keine sichere Zuordnung möglich, <sup>1</sup>(Lee und Noble 2003), <sup>2</sup>(Serra Bonvehí und Ventura Coll 2002), <sup>3</sup>(Culleré *et al.* 2004), <sup>4</sup>(Chung *et al.* 1993), <sup>5</sup>(Adedeji *et al.* 1991), <sup>6</sup>(Fernandez *et al.* 2005), <sup>7</sup>(Komes *et al.* 2006), <sup>8</sup>(San-Juan *et al.* 2010), <sup>9</sup>(Schnermann und Schieberle 1997), <sup>10</sup>(Yanagimoto *et al.* 2004), <sup>11</sup>(Mayorga *et al.* 2001), <sup>12</sup>(Cutzach *et al.* 1997), <sup>13</sup>(Andersen *et al.* 1987), <sup>14</sup>Janáčková *et al.* 2008

Die Produktion der Hauptaromakomponenten in 4 L Medium (Maßstab 40:1) entsprach der Bildung in 100 mL- (Maßstab 1:1) und 400 mL- (Maßstab 4:1) Volumen (Abbildung 2.27). Die Maßstabsvergrößerungen waren ohne größere Modifikation mit analogen Gehalten an relevanten Aromastoffen möglich.

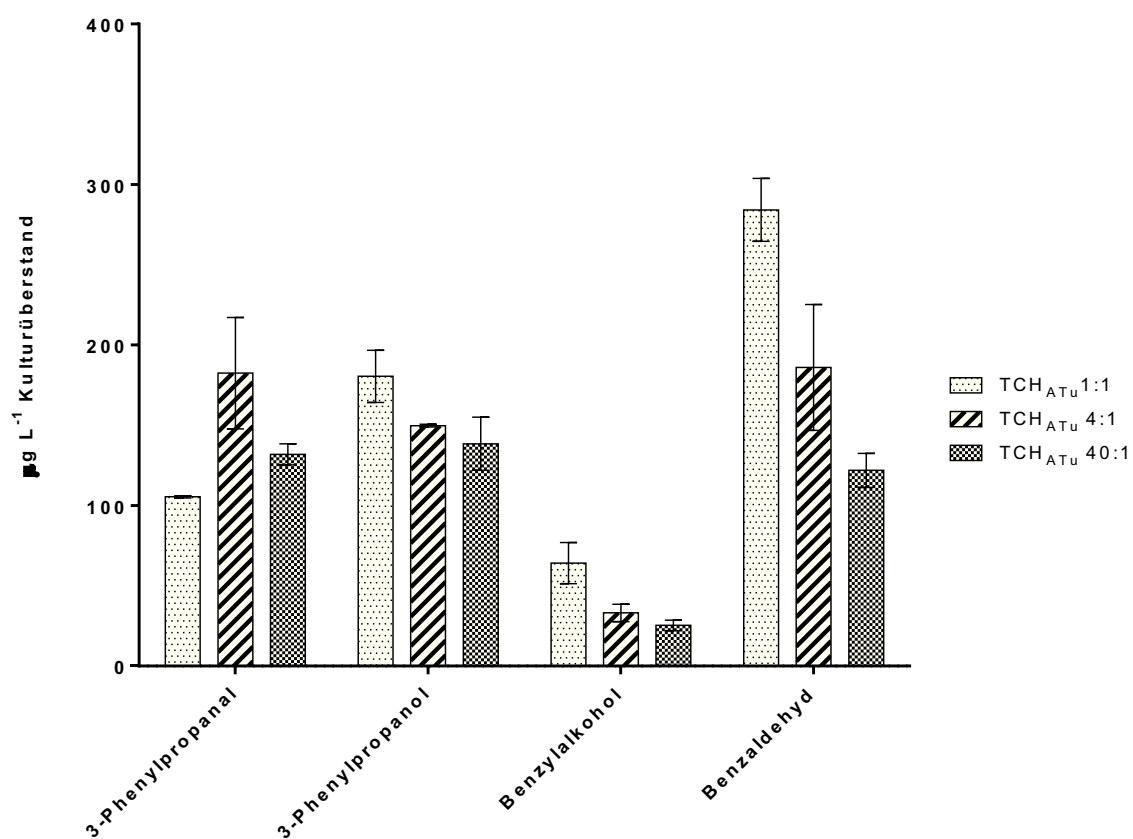


Abbildung 2.27: Vergleich der Gehalte relevanter Aromastoffe aus der Biotransformation von unbehandeltem Apfeltrester durch *T. chioneus* ( $TCH_{ATu}$ ) in 100 mL Medium (1:1), 400 mL Medium (4:1) und 4 L Medium (40:1)

### 2.1.6.7 Abtrennung der durch Fermentation von unbehandeltem Apfeltrester durch *T. chioneus* gewonnenen Aromastoffe mittels Pervaporation

Die Biotransformation von unbehandeltem Apfeltrester durch *T. chioneus* wurde in 5 L Medium M2 (Maßstab 50:1) durchgeführt (5.2.5.4). Der filtrierte Kulturüberstand wurde im Anschluss durch eine Pervaporation gereinigt und konzentriert (*Downstream Processing*; 5.2.10). Das Permeat aus der Kühlfalle und das Konzentrat aus dem Feedtank (siehe Abbildung 5.2) wurden sensorisch bewertet (Tabelle 2.32), sowie mittels HS-SPME und flüssig/flüssig extrahiert. Im Anschluss wurden die Proben gaschromatographisch-massenspektrometrisch untersucht.

Tabelle 2.32: Geruchseindrücke der Biotransformation von unbehandeltem Apfeltrester durch *T. chioneus* ( $TCH_{ATu}$ , Kulturabbruch Tag 4) im Referenzmedium (M2) und nach Pervaporation der Kulturbrühe

Probe	sensorischer Gesamteindruck
$TCH_{ATu}$	Pflaume, blumig, Zimt, Kompott
$TCH_{ATu}$ Permeat	süßlich, medizinisch, überreife Früchte, Quitten
$TCH_{ATu}$ Konzentrat	Pflaume, süßlich, Kompott

### Untersuchung der flüchtigen Verbindungen aus der Kultivierung von *T. chioneus* mit unbehandeltem Apfeltrester sowie des Permeats und des Konzentrats der Pervaporation mittels HS-SPME

Das filtrierte Kulturmedium der Biotransformation von unbehandeltem Apfeltrester durch *T. chioneus* sowie das aus der Pervaporation des Kulturüberstandes gewonnene Permeat und Konzentrat wurden mittels HS-SPME extrahiert und gaschromatographisch-massenspektrometrisch untersucht (Abbildung 2.28). Die flüchtigen Verbindungen wurden anhand des Vergleiches der ermittelten Kováts-Indizes und massenspektrometrischen Daten mit Literaturwerten identifiziert (Tabelle 2.33).



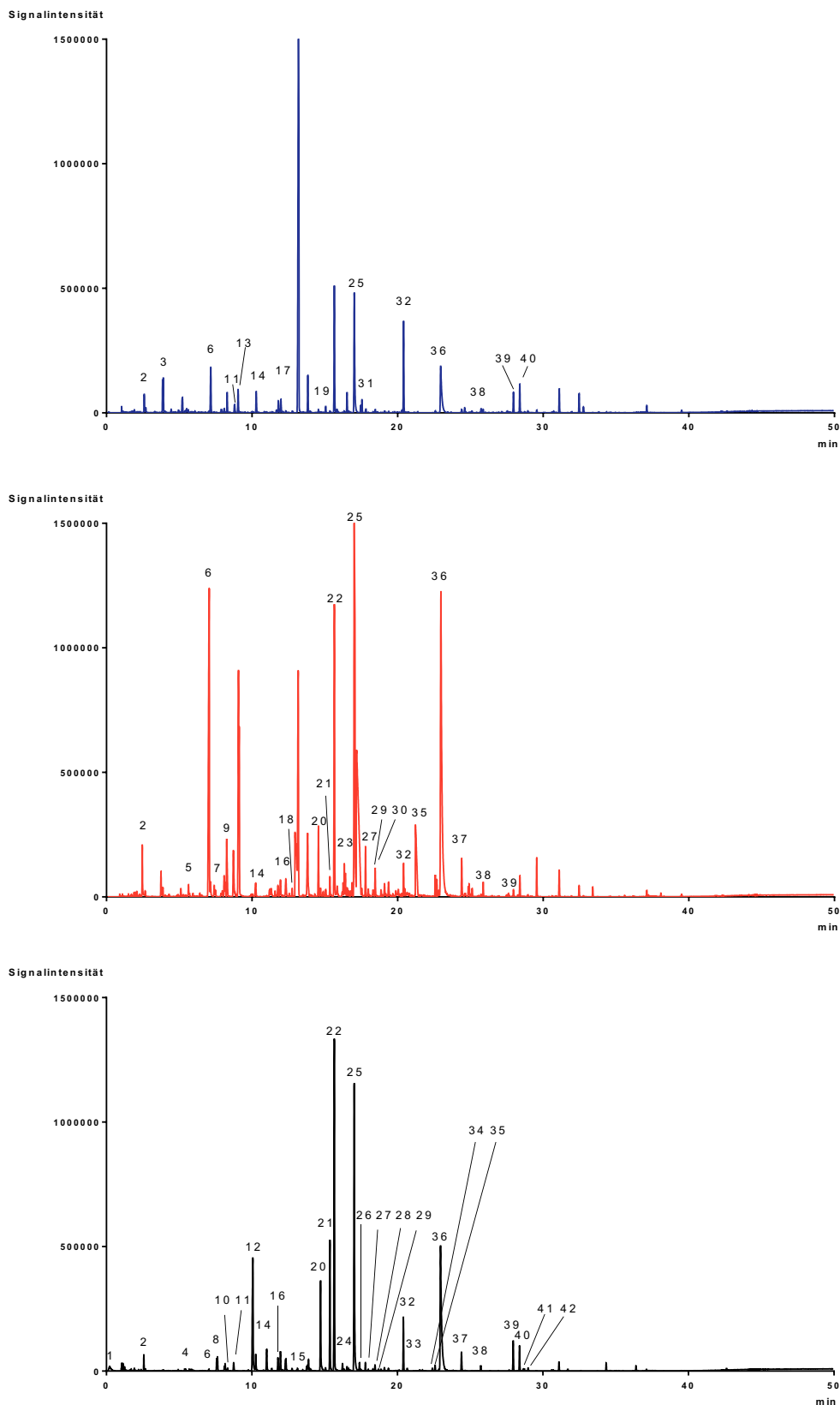


Abbildung 2.28: GC/MS-Chromatogramme der HS-SPME-Extraktion der Kultivierung von *T. chioneus* mit unbehandeltem Apfeltrester ( $TCH_{ATu}$ , Kulturtage 4, schwarz) sowie des zugehörigen Permeats entnommen aus der Kühlfalle und des Konzentrats aus dem Feedtank (Abbildung 5.2;  $TCH_{ATu}$  Permeat: rot und  $TCH_{ATu}$  Konzentrat: blau)

Tabelle 2.33: Mittels HS-SPME-GC/MS ermittelte flüchtige Verbindungen der Kultivierung von *T. chioneus* mit unbehandeltem Apfeltrester ( $TCH_{ATu}$ , Kulturabbruch Tag 4) in 5 L Medium M2 sowie des zugehörigen Permeats und des Konzentrats ( $TCH_{ATu}$  Permeat und  $TCH_{ATu}$  Konzentrat) mit den zugehörigen Kováts-Indizes der Probe (KI) an einer HP-Innowax, MS-Strukturvorschlägen sowie dazugehörigen Literaturwerten

#	MS-Strukturvorschlag	KI Lit.	KI ( $TCH_{ATu}$ ) Innowax	KI ( $TCH_{ATu}$ Permeat) Innowax	KI ( $TCH_{ATu}$ Konzentrat) Innowax
1	Pentan	+	n.b.		
2	Ethanol	926 <sup>1</sup>	n.b.	n.b.	n.b.
3	2,2-Dimethylhexanal	+			1073
4	Hexanal	1079 <sup>2</sup>	1081		
5	2-Methylpropan-1-ol	1099 <sup>19</sup>		1086	
6	Butan-1-ol	1146 <sup>3</sup>	1145	1148	1148
7	Isobutylbutyrat	+		1159	
8	2-Methylheptan-3-on	+	1167		
9	2-Ethylhexanal	+		1182	
10	Heptanal	1200 <sup>2</sup>	1184		
11	2-Methylbutan-1-ol	1206 <sup>4</sup>	1204		1205
12	Octan-3-on	1192 <sup>5</sup>	1255		
13	Butansäurebutylester	+			1218
14	Methylpyrazin	1251 <sup>6</sup>	1262	1261	1263
15	2-Ethyl-6-methylpyrazin	1381 <sup>7</sup>	1379		
16	2,5-Dimethylpyrazin	1320 <sup>7</sup>	1315	1315	
17	2,6-Dimethylpyrazin	1324 <sup>3</sup>			1323
18	Hexan-1-ol	1354 <sup>4</sup>		1352	
19	Octan-2-ol	1421 <sup>21</sup>		1419	1419
20	2-Octenal	1423 <sup>2</sup>	1425		
21	Oct-1-en-3-ol	1452 <sup>8</sup>	1451		
22	Furfural	1467 <sup>9</sup>	1463	1463	
23	2-Ethylhexanol	1474 <sup>15</sup>		1488	
24	Decanal	1497 <sup>2</sup>	1495		
25	Benzaldehyd	1500 <sup>10</sup>	1516	1517	1516
26	2-Nonenal	1538 <sup>11</sup>	1531		
27	Linalool	1554 <sup>12</sup>	1549	1548	
28	5-Methyl-2-furaldehyd	1578 <sup>20</sup>	1570		
29	Methyl-2-furoat	1569 <sup>13</sup>	1575	1575	
30	Octan-1-ol	1557 <sup>11</sup>		1576	
31	Methylfuran-3-carboxylat	+			1576
32	2-Furanmethanol	1669 <sup>14</sup>	1659	1659	1659
33	2-Hydroxybenzaldehyd	1658 <sup>15</sup>	1670		
34	$\alpha$ -Farnesen	1772 <sup>16</sup>	1747		
35	Phenylelessigsäure-methylester	1758 <sup>17</sup>	1756	1756	
36	3-Phenylpropanal	1723 <sup>18</sup>	1772	1773	1772

#	MS-Strukturvorschlag	KI Lit.	KI (TCH <sub>ATu</sub> ) Innowax	KI (TCH <sub>ATu Permeat</sub> ) Innowax	KI (TCH <sub>ATu Konzentrat</sub> ) Innowax
37	Hydrozimtsäuremethylester	+	1840	1840	
38	2-Phenylethanol	1916 <sup>19</sup>	1902	1902	1902
39	1H-Pyrrol-2-carboxaldehyd	2036 <sup>14</sup>	2014	2014	2014
40	3-Phenylpropanol	2039 <sup>16</sup>	2037		2037
41	Caprylsäure	2083 <sup>12</sup>	2054		
42	Zimtsäuremethylester	2056 <sup>2</sup>	2067		

<sup>+</sup> keine Literaturwerte vorhanden, n.b.: keine sichere Zuordnung möglich,<sup>1</sup> (Chung *et al.* 1993),<sup>2</sup> (Rychlik *et al.* 1998),<sup>3</sup> (Fukami *et al.* 2002),<sup>4</sup> (Lee und Noble 2003),<sup>5</sup> (Tressl *et al.* 1982),<sup>6</sup> (Serra Bonvehí und Ventura Coll 2002),<sup>7</sup> (Wong und Bernhard 1988),<sup>8</sup> (Kaya *et al.* 1999),<sup>9</sup> (Culleré *et al.* 2004),<sup>10</sup> (Chung *et al.* 1993),<sup>11</sup> (Valim *et al.* 2003),<sup>12</sup> (Choi 2003),<sup>13</sup> (Chen *et al.* 1986),<sup>14</sup> (Yanagimoto *et al.* 2004),<sup>15</sup> (Pino und Marbot 2001),<sup>16</sup> (Mayorga *et al.* 2001),<sup>17</sup> (Steinhaus und Schieberle 2000),<sup>18</sup> (Fernandez *et al.* 2005),<sup>19</sup> (San-Juan *et al.* 2010),<sup>20</sup> (Comuzzo *et al.* 2006),<sup>21</sup> (Fu *et al.* 2001),

#### Untersuchung der flüchtigen Verbindungen aus der Kultivierung von *T. chioneus* mit unbehandeltem Apfeltrester sowie des Permeats und des Konzentrats der Pervaporation mittels flüssig/flüssig Extraktion

Die filtrierte Kulturbrühe der Biotransformation von unbehandeltem Apfeltrester durch *T. chioneus* sowie das aus der Pervaporation des Kulturüberstandes gewonnene Permeat und Konzentrat wurden flüssig/flüssig extrahiert und gaschromatographisch-massenspektrometrisch untersucht (Abbildung 2.29). Die flüchtigen Verbindungen wurden durch den Vergleich der ermittelten Kováts-Indizes und Massenspektren mit Literaturwerten bestimmt (Tabelle 2.34).

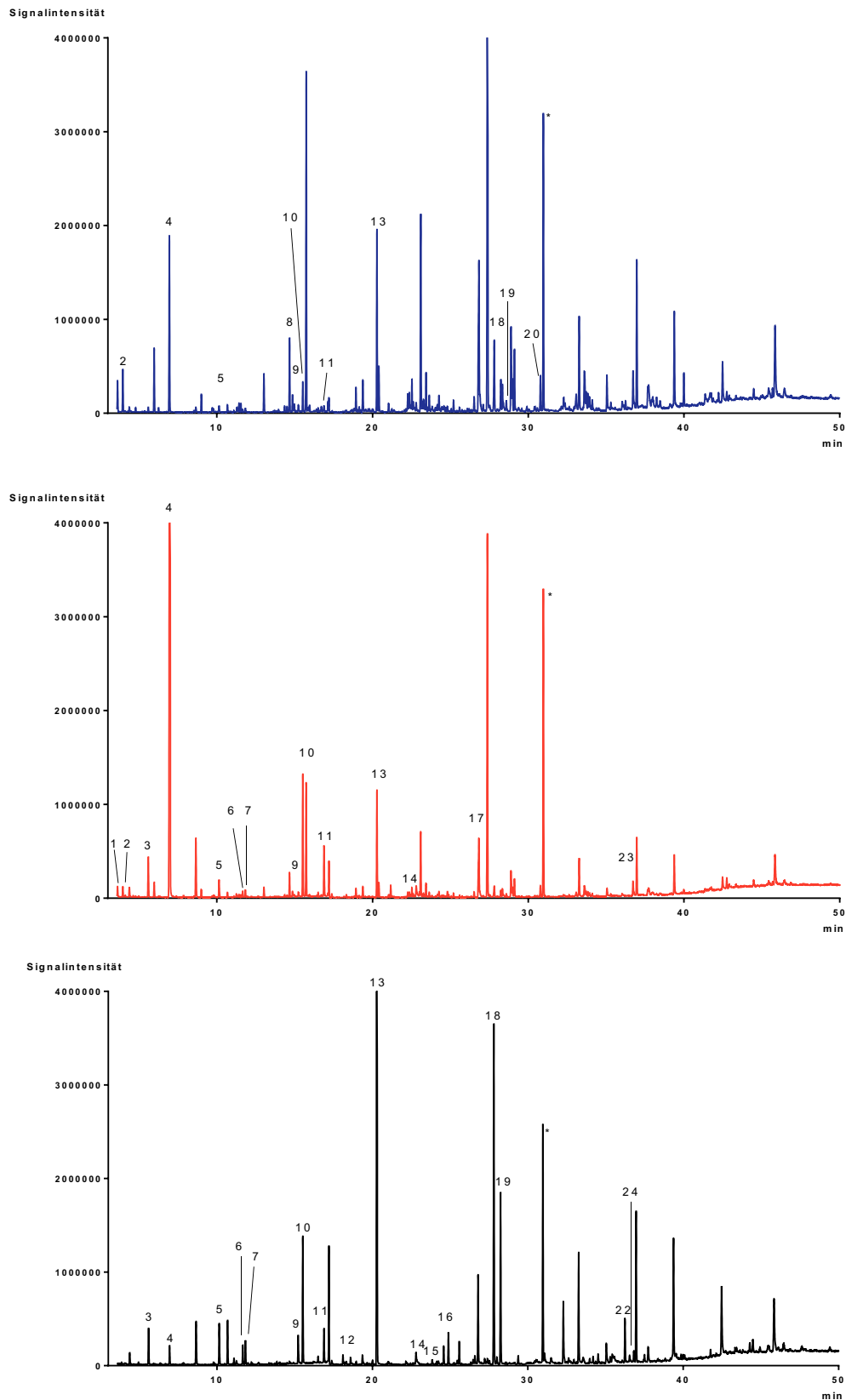


Abbildung 2.29: GC/MS-Chromatogramme der flüssig/flüssig-Extraktion der Kultivierung von *T. chioneus* mit unbehandeltem Apfeltrester (TCH<sub>ATu</sub>, Kulturtag 4, schwarz) sowie des zugehörigen Permeats entnommen aus der Kühlfalle und des Konzentrats aus dem Feedtank (Abbildung 5.2; TCH<sub>ATu</sub> Permeat: rot und TCH<sub>ATu</sub> Konzentrat: blau), \*= Interner Standard (Thymol)

Tabelle 2.34: Mittels GC/MS ermittelte flüchtige Verbindungen des flüssig/flüssig Extraktes der Kultivierung von *T. chioneus* mit unbehandeltem Apfeltrester ( $TCH_{ATu}$ , Kulturabbruch Tag 4) in 5 L Medium M2 sowie des zugehörigen Permeats und des Konzentrats ( $TCH_{ATu}$  Permeat und  $TCH_{ATu}$  Konzentrat) mit den zugehörigen Kováts-Indizes der Probe (KI) an einer HP-Innowax, MS-Strukturvorschlägen sowie dazugehörigen Literaturwerten

#	MS-Strukturvorschlag	KI Lit.	KI ( $TCH_{ATu}$ ) Innowax	KI ( $TCH_{ATu}$ Permeat) Innowax	KI ( $TCH_{ATu}$ Konzentrat) Innowax
1	Decan	1000 <sup>6</sup>		n.b.	
2	2-Methyldecan	1038 <sup>13</sup>		1082	1018
3	2-Methylpropan-1-ol	1099 <sup>1</sup>	1090	1090	
4	Butan-1-ol	1146 <sup>2</sup>	1145	1148	1145
5	Methylpyrazin	1251 <sup>3</sup>	1260	1262	1262
6	2,5-Dimethylpyrazin	1320 <sup>4</sup>	1315	1315	
7	2,6-Dimethylpyrazin	1324 <sup>2</sup>	1322	1322	
8	6-Propyltridecan	+			1429
9	Essigsäure	1477 <sup>5</sup>	1451	1452	1452
10	Furfural	1485 <sup>5</sup>	1463	1463	1463
11	Benzaldehyd	1500 <sup>6</sup>	1516	1516	1516
12	Isobuttersäure	1588 <sup>5</sup>	1567		
13	2-Furanmethanol	1661 <sup>4</sup>	1660	1659	1659
14	3-Phenylpropanal	1723 <sup>7</sup>	1772	1772	
15	2-Hydroxy-3-methyl-2-cyclopenten-1-on	1837 <sup>12</sup>	1820		
16	Benzylalkohol	1869 <sup>8</sup>	1870		
17	Dodecan-1-ol	1970 <sup>14</sup>		1965	
18	1H-Pyrrol-2-carboxaldehyd	2036 <sup>9</sup>	2014		2014
19	3-Phenylpropanol	2039 <sup>7</sup>	2037		2037
20	Dodecylhexanoat	+			2171
21	Thymol (IST)	2205 <sup>10</sup>	2181	2181	2181
22	5-Hydroxy-methylfurfural	2461 <sup>11</sup>	2488		
23	Dodecyl-3-mercaptopropionat	+		2515	
24	3-Hydroxy- $\beta$ -damascon	2563 <sup>13</sup>	2524		

+ keine Literaturwerte vorhanden, n.b.: keine sichere Zuordnung möglich,<sup>1</sup>(San-Juan *et al.* 2010),

<sup>2</sup>(Fukami *et al.* 2002), <sup>3</sup>(Serra Bonvehí und Ventura Coll 2002), <sup>4</sup>(Wong und Bernhard 1988),

<sup>5</sup>(Culleré *et al.* 2004), <sup>6</sup>(Chung *et al.* 1993), <sup>7</sup>(Fuhrmann und Grosch 2002), <sup>8</sup>(Shams-Ardakani *et al.*

2005), <sup>9</sup>(Krist *et al.* 2005), <sup>10</sup>(Kaya *et al.* 1999), <sup>11</sup>(Rega *et al.* 2009), <sup>12</sup>(Cutzach *et al.* 1997),

<sup>13</sup>(Aubert *et al.* 2003), <sup>13</sup>(Bukvicki *et al.* 2012), <sup>14</sup>(de A. Marques *et al.* 2000)

Um die durchgeführte Pervaporation zu beurteilen, wurden die Gehalte der Biotransformationsprodukte in der verwendeten Kultur, im Permeat und im Konzentrat mit Hilfe des Internen Standard Thymol ermittelt (5.2.8.1; Abbildung 2.30; Tabelle 2.35). Die Trennleistung der Pervaporation wurde anhand der Trennfaktoren bestimmt (5.2.10; Tabelle 2.35).

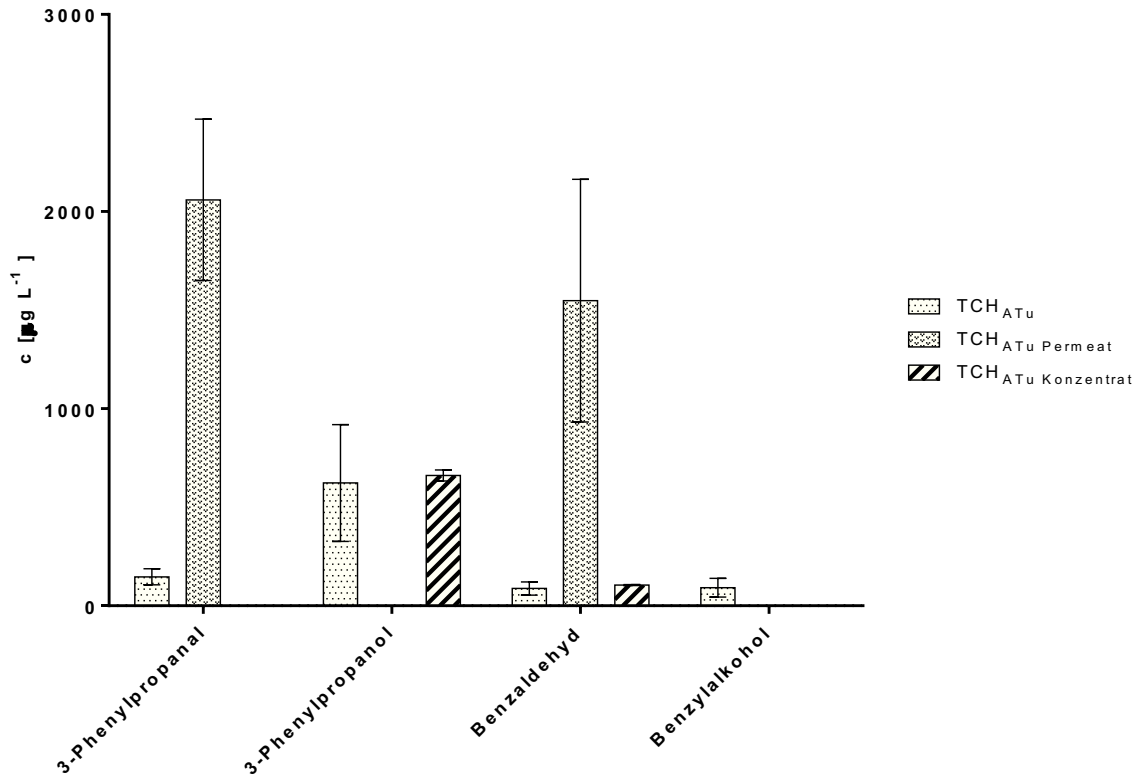


Abbildung 2.30: Gehalte ausgewählter Biotransformationsprodukte nach Fermentation von Apfeltrester durch *T. chioneus* ( $TCH_{ATu}$ ) im Vergleich zu den Permeatproben sowie den Konzentratproben (Abbildung 5.2;  $TCH_{ATu}$  Permeat und  $TCH_{ATu}$  Konzentrat)

Tabelle 2.35: Bilanzierung ausgewählter Biotransformationsprodukte von unbehandeltem Apfeltrester durch *T. chioneus* ( $TCH_{ATu}$ , Kulturtag 4) nach Pervaporation (5.2.10)

Substanz	Feed [µg]	Permeat [µg]	Konzentrat [µg]	Ausbeute Permeat [%]	Rückstand Konzentrat [%]	Verlust [%]	Trenn- faktor
3-Phenyl- propanal	147	31	-	21	-	79	14
3-Phenyl- propanol	623	-	19	-	3	97	0
Benzyl- alkohol	92	-	-	-	-	100	0
Benz- aldehyd	88	23	3	26	3	69	18

Durch die Pervaporation wurden die Aldehyde 3-Phenylpropanal und Benzaldehyd selektiv über die Membran abgetrennt und konzentriert. Die zwei untersuchten Aldehyde wurden im Permeat, welches aus der Kühlfalle entnommen wurde, mit einem Trennfaktor von 14 und 18 nachgewiesen. Im Permeat wurde noch 22% des 3-Phenylpropanals und 28% des Benzaldehyds wiedergefunden. Es kam im Zuge der Pervaporation zu deutlichen Verlusten.

3-Phenylpropanol wurde in den Konzentraten nachgewiesen und nicht über die Membran abgetrennt und konzentriert. Im Konzentrat wurde noch 3% des 3-Phenylpropanols wiedergefunden. Benzylalkohol wurde in den Permeat- und den Konzentratproben nicht mehr nachgewiesen (Trennfaktor 0). Eine weitere Optimierung dieses Verfahrens zur Trennung und Konzentrierung ist notwendig.

## 2.2 Entwicklung neuartiger Getränke durch den Einsatz von essbaren Basidiomyceten

### 2.2.1 Screening

Für das Screening wurden sieben Basidiomyceten (Tabelle 5.22) mit fünf verschiedenen Substraten (Tabelle 5.23) kultiviert. Die erste Phase des Screenings beinhaltete die olfaktorische Bewertung der Fermentationen sowie die dazugehörigen Substratblindwerte (5.3.1.1). In der zweiten Phase des Screenings wurden alle olfaktorisch ansprechenden Biotransformationen aus Phase eins des Screenings erneut kultiviert (5.3.1.2) und zur gleichen Zeit, sowie eine Stunde zuvor und eine Stunde danach verkostet. Die fünf verwendeten Substrate wurden vorab sensorisch evaluiert und dienten als Referenz für die jeweiligen Substrate (Tabelle 2.36).

*Tabelle 2.36: Verkostung der verwendeten Substrate (Tabelle 5.23)*

<b>Substrat</b>	<b>Geschmack</b>	<b>Geruch</b>
Haferdrink (HD)	süß, Stärke, Hafer	süßlich, Hafer, Getreide, Apfel
Reisdrink (RD)	süß, Reis, wässrig	wässrig, Reis, Stärke
Sojadrink (SD)	bohlig, kratzig, bitter, Getreide	süßlich, bohlig, Getreide
Bierwürze (gehopft) (BWZ)	bitter, würzig, süß, sauer	Bier, süßlich, herb
Bierwürze (ungehopft) (BWZu)	süß, bitter, würzig	Malz, würzig, süßlich, herb

Die vielversprechendsten Stamm/Substrat-Kombinationen des Screenings unterschieden sich deutlich vom Substrat-Blindwert (Substrat<sub>BW</sub>). Die Fermentationen wiesen ein großes Spektrum an Aromaeindrücken von süßlich, blumig, Honig bis grün und Gras auf (Tabelle 2.37).

Tabelle 2.37: Verkostungen nach Fermentation eines Substrates durch einen Basidiomyceten (Pilz<sub>Substrat</sub>)

Organismus	Substrat	Kultur-abbruch [h]	gustatorischer Eindruck des fermentierten Getränkes
<i>Pleurotus citrinopileatus</i> (PCI)	HD	5	erfrischend süß, Getreide
<i>I. benzoinum</i>	BWZu	7	grün, Gras
<i>T. chioneus</i>	BWZu	17	blumig, süß, fruchtig, Honig
<i>W.cocos</i>	RD	6	süß, Getreide, fruchtig
<i>W.cocos</i>	BWZu	25	blumig, Zitrone, süß, Honig, Tee, herb

Die Gesamtproteingehalte, Gesamtfettgehalte und Gesamtzuckergehalte und die pH-Werte der verwendeten Substrate sowie die ausgewählten Fermentationen wurden ermittelt (Anhang 7.2).

## 2.2.2 Auswahl der vielversprechendsten Getränkefermentationen

Am Ende der Screeningphase wurden die vielversprechendsten Kulturen ausgewählt. Hierbei handelte es sich um die Kultivierungen von *T. chioneus*, *W. cocos* und *I. benzoinum* mit dem Substrat ungehopfte Bierwürze. Alle drei Kultivierungen zeichneten sich durch ihr intensives Aroma aus.

## 2.2.3 Ungehopfte Bierwürze

Das Substrat ungehopfte Bierwürze und die vielversprechendsten Fermentationen sowie die zugehörigen Substratblindwerte wurden flüssig/flüssig extrahiert (5.3.2.1) und mittels GC/O und GC/MS analysiert (5.3.2.2).

Bei der gaschromatographisch-olfaktometrischen Untersuchung (5.3.2.2) des Aroma-extraktes der ungehopften Bierwürze (Nullwert) wurden 26 verschiedene geruchsaktive Substanzen detektiert (Abbildung 2.31, Tabelle 2.38).



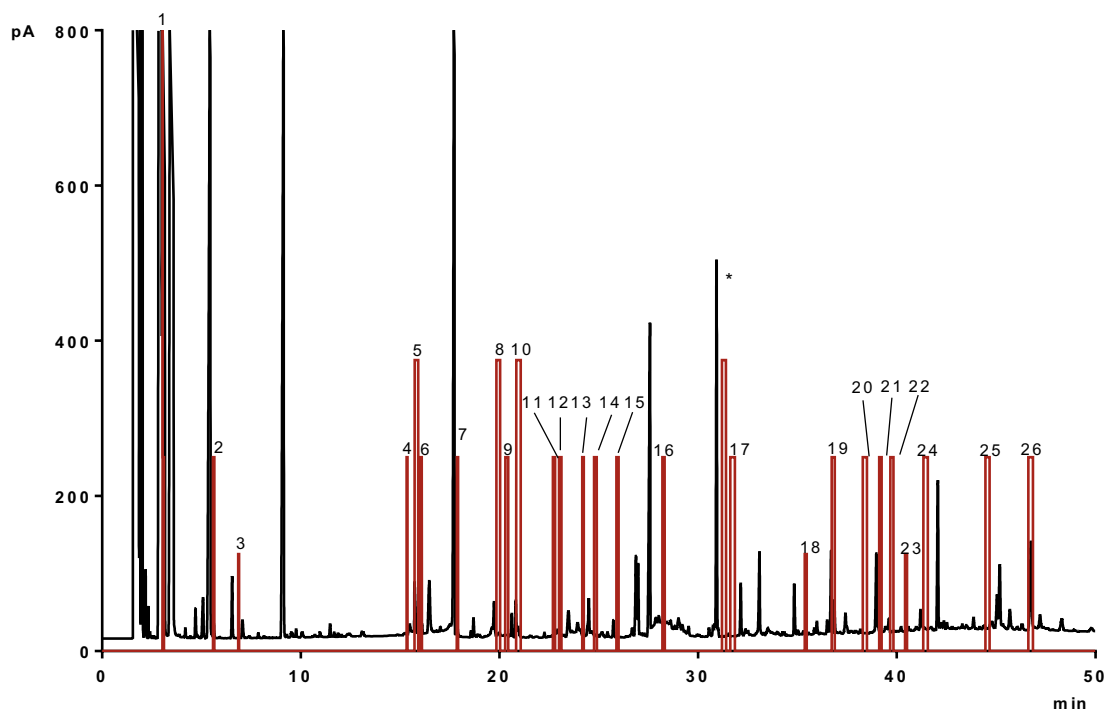


Abbildung 2.31: GC/FID/O-Chromatogramm des Nullwertes ungehopfter Bierwürze (0 h) mit FID- (schwarz) und ODP-Spur (rot); \* = Interner Standard

Tabelle 2.38: Übersicht über die olfaktorisch wahrgenommenen Substanzen der ungehopften Bierwürze (0 h) zusammen mit den zugehörigen Kováts-Indizes der Probe (KI), dem MS-Strukturvorschlag sowie dem Literaturgeruchseindruck

#	Geruchseindruck	KI GC/O HP- Innowax	KI GC/MS HP- Innowax	Strukturvorschlag	Geruch Lit.
1	süßlich	864		n.b.	
2	Kleber	1029	1039	Propan-1-ol	fruchtig, Plastik <sup>1</sup>
3	süßlich	1080	1089	2-Methylpropan-1-ol	Klebstoff, Alkohol <sup>2</sup>
4	muffig, säuerlich	1425			
5	Essig	1438	1452	Essigsäure	Essig <sup>3</sup>
6	muffig	1452	1465	Furfural	Holz, süß <sup>3</sup>
7	fruchtig, Zitrone	1523	1539	Butan-2,3-diol	butterig, cremig <sup>4</sup>
8	muffig	1614	1629	Buttersäure	Käse <sup>3</sup>
9	muffig	1630	1662	2-Furanmethanol	verbrannt, schweißig <sup>5</sup>
10	Schweiß	1656	1670	3-Methylbuttersäure	Käse <sup>3</sup>
11	muffig, säuerlich	1721		n.b.	
12	fruchtig	1753		n.b.	
13	blumig	1799	1806	<i>n</i> -Octadecan	süß, fruchtig <sup>6</sup>
14	blumig, rauchig	1828	1845	Capronsäure	Käse <sup>3</sup>
15	blumig, Blüten, Rosen	1889	1906	2-Phenylethanol	Rose <sup>3</sup>
16	süßlich	2008		n.b.	

#	Geruchseindruck	KI GC/O HP- Innowax	KI GC/MS HP- Innowax	Strukturvorschlag	Geruch Lit.
17	würzig, rauchig	2204	2192	4-Vinylguaiacol	rauchig, würzig, geräuchert <sup>7</sup>
18	süßlich	2429		n.b.	
19	blumig, würzig	2528	2550	Phenyllessigsäure	Honig, blumig <sup>8</sup>
20	süßlich, blumig, fruchtig	2607	2636	n.b.	
21	süßlich, blumig	2670	2694	n.b.	
22	süßlich, blumig	2707		n.b.	
23	süßlich, blumig	2756		n.b.	
24	süßlich, säuerlich, Butter	>2800	>2800	Zimtsäure	holzig <sup>9</sup>
25	süßlich, blumig	>2800		n.b.	
26	süßlich, würzig	>2800	>2800	n.b.	

n.b.: keine sichere Zuordnung möglich, <sup>1</sup>(Le Guen *et al.* 2000), <sup>2</sup>(Lee und Noble 2003), <sup>3</sup>(Culleré *et al.* 2004), <sup>4</sup>(Giri *et al.* 2010), <sup>5</sup>(Chin *et al.* 2011), <sup>6</sup>(Choi 2003), <sup>7</sup>(Komes *et al.* 2006), <sup>8</sup>(Escudero *et al.* 2007), <sup>9</sup>(Ong und Acree 1999)

Vierzehn aromaaktive Verbindungen wurden durch Vergleich der Massenspektren und ermittelten Kováts-Indizes mit denen authentischer Standards und Literaturdaten identifiziert (Tabelle 2.39; Anhang 7.2 und 7.3).

Tabelle 2.39: Mittels GC/MS identifizierte geruchsaktive Substanzen des flüssig/flüssig Extraktes von ungehopfter Bierwürze (Nullwert) mit Literaturvergleichswerten

Substanz	KI HP-Innowax			KI DB-5MS		
	GC/MS	Standard	Lit.	GC/MS	Standard	Lit.
Propan-1-ol	1039	1042	1045 <sup>1</sup>	<800	<800	558 <sup>7</sup>
2-Methylpropan-1-ol	1089	1092	1085 <sup>2</sup>	<800	<800	653 <sup>18</sup>
Essigsäure	1452	1452	1434 <sup>2</sup>	<800	<800	660 <sup>17</sup>
Furfural	1465	1477	1458 <sup>2</sup>	<800	833	832 <sup>16</sup>
Butan-2,3-diol	1539	1522	1523 <sup>3</sup>	<800	<800	768 <sup>10</sup>
Buttersäure	1629	1617	1628 <sup>4</sup>	<800	<800	821 <sup>15</sup>
2-Furanmethanol	1662	1665	1669 <sup>6</sup>	857	860	866 <sup>7</sup>
3-Methylbuttersäure	1670	1661	1660 <sup>8</sup>	844	856	844 <sup>8</sup>
<i>n</i> -Octadecan	1806	1802	1805 <sup>9</sup>	1800	1800	1800 <sup>14</sup>
Capronsäure	1845	1837	1829 <sup>10</sup>	979	984	1019 <sup>10</sup>
2-Phenylethanol	1906	1901	1902 <sup>11</sup>	1112	1115	1118 <sup>10</sup>
4-Vinylguaiacol	2192	2208	2200 <sup>2</sup>	1309	1310	1313 <sup>19</sup>
Phenylelessigsäure	2550	2548	2571 <sup>5</sup>	1241	1246	1274 <sup>4</sup>
Zimtsäure	>2800	>2800	2852 <sup>8</sup>	1420	1426	1394 <sup>8</sup>

<sup>1</sup>(Le Guen *et al.* 2000), <sup>2</sup>(Lee und Noble 2003), <sup>3</sup>(Wei *et al.* 2001), <sup>4</sup>(Valim *et al.* 2003), <sup>5</sup>(Ferreira *et al.* 2001), <sup>6</sup>(Yanagimoto *et al.* 2004), <sup>7</sup>(Leffingwell und Alford 2005), <sup>8</sup>(Ong und Acree 1999), <sup>9</sup>(Choi 2003), <sup>10</sup>(Schnermann und Schieberle 1997), <sup>11</sup>(Varming *et al.* 2004), <sup>12</sup>(Ong *et al.* 1998), <sup>13</sup>(Jordán *et al.* 2002b), <sup>14</sup>(Morteza-Semnani und Saeedi 2005), <sup>15</sup>(Zehentbauer und Reineccius 2002), <sup>16</sup>(Machiels *et al.* 2003), <sup>17</sup>(Chung *et al.* 1993), <sup>18</sup>(Adedeji *et al.* 1991), <sup>19</sup>(El-Sayed *et al.* 2005)

Parallel zu den Fermentationen von ungehopfter Bierwürze durch *I. benzoinum*, *T. chioneus* und *W. cocos* wurden Substratblindwerte geführt. Die Aromaextrakte der Substratblindwerte der ungehopften Bierwürze (7 h, 17 h und 25 h) wurden gaschromatographisch-olfaktometrisch untersucht (5.3.2.2).

Im Substratblindwert der ungehopften Bierwürze nach 7 h wurden 24 verschiedene geruchsaktive Substanzen in mindestens drei voneinander unabhängigen Läufen wahrgenommen und zwölf Aromastoffe identifiziert (Anhang 7.2 und 7.3). Als aromaaktive Substanzen wurden zusätzlich 5-Methylheptan-3-on und Maltol im Vergleich zum Nullwert ungehopfte Bierwürze identifiziert. Butan-2,3-diol, *n*-Octadecan, Phenylelessigsäure und Zimtsäure wurden nicht mehr als Aromastoff nachgewiesen.

Der Substratblindwert der ungehopften Bierwürze nach 17 h wies 28 verschiedene geruchsaktive Substanzen auf und 14 Aromastoffe wurden identifiziert (Anhang 7.2 und 7.3). 2-Ethyl-2-methyl-1,3-dioxolan, Butan-1-ol, 5-Methylheptan-3-on und Maltol wurden darüber hinaus im Substratblindwert nach 17 h im Vergleich zum Nullwert ungehopfte Bierwürze nachgewiesen. Furfural, Butan-2,3-diol, *n*-Octadecan, Phenyllessigsäure und Zimtsäure wurden nicht identifiziert.

Im Aromaextrakt des Substratblindwertes ungehopfte Bierwürze nach 25 h wurden 26 geruchsaktive Substanzen olfaktometrisch nachgewiesen und zehn Aromastoffe identifiziert (Anhang 7.2 und 7.3). 5-Methylheptan-3-on und Maltol wurden zusätzlich im Substratblindwert 25 h im Vergleich zum Nullwert ungehopfte Bierwürze nachgewiesen.

## 2.2.4 Fermentation von ungehopfter Bierwürze durch *I. benzoinum*

Bei der gaschromatographisch-olfaktometrischen Analyse (5.3.2.2) des flüssig/flüssig Extraktes der Fermentation von ungehopfter Bierwürze durch *I. benzoinum* nach 7 h wurden 30 verschiedene geruchsaktive Substanzen detektiert (Abbildung 2.32, Tabelle 2.40), die in mindestens drei voneinander unabhängigen Läufen wahrgenommen wurden.

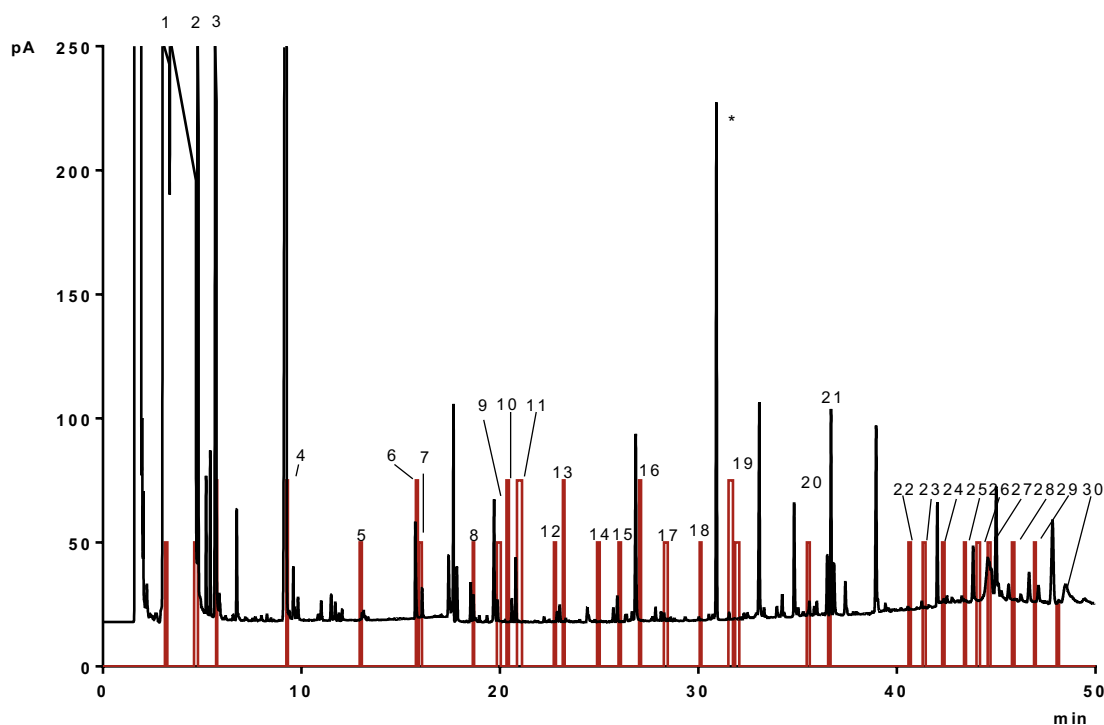


Abbildung 2.32: GC/FID/O-Chromatogramm der Kultivierung von *I. benzoinum* mit ungehopfter Bierwürze (IBE<sub>BWZ,U</sub>, 7 h) mit FID- (schwarz) und ODP-Spur (rot); \* = Interner Standard

*Tabelle 2.40: Übersicht über die olfaktorisch wahrgenommenen Substanzen der Kultivierung von I. benzoinum mit ungehopfter Bierwürze (IBE<sub>BWZu</sub>, 7 h) zusammen mit den zugehörigen Kováts-Indizes der Probe (KI), dem MS-Strukturvorschlag sowie dem Literaturgeruchseindruck*

#	Geruchseindruck	KI GC/O HP- Innowax	KI GC/MS HP- Innowax	Strukturvorschlag	Geruch Lit.
1	süßlich, fruchtig	893	—	n.b.	
2	fruchtig, süßlich	987	—	n.b.	
3	fruchtig	1042	1043	Propan-1-ol	fruchtig, Plastik <sup>1</sup>
4	Alkohol, Lösungsmittel	1186	1190	5-Methylheptan-3-on	
5	muffig, säuerlich, Pilz	1336	1347	n.b.	
6	Essig	1439	1452	Essigsäure	Essig <sup>2</sup>
7	Kartoffel, Erde	1453	1465	Furfural	Holz, süß <sup>2</sup>
8	muffig	1556	1569	Isobuttersäure	Käse <sup>2</sup>
9	säuerlich, Käse	1613	1628	Buttersäure	Käse <sup>2</sup>
10	muffig, Pilz	1647	1661	2-Furanmethanol	verbrannt, schweißig <sup>3</sup>
11	Schweiß, säuerlich	1656	1670	3-Methylbuttersäure	Käse <sup>2</sup>
12	muffig, süßlich	1753	1767	n.b.	
13	frisch, grün, Gurke	1759	1774	1,4-Dioxan-2-ol	
14	Kartoffel, Erde, Blätter	1845	1845	n.b.	
15	süßlich, blumig, säuerlich	1890	1906	2-Phenylethanol	Rose <sup>4</sup>
16	süßlich, Zuckerwatte	1938	1956	Maltol	karamellartig <sup>5</sup>
17	fruchtig, frisch	2016	2034	Zimtaldehyd	Zimt, Rosenapfel <sup>6</sup>
18	Minze	2118	2137	n.b.	
19	rauchig	2205	2191	4-Vinylguaiacol	rauchig, würzig, geräuchert <sup>7</sup>
20	blumig, süßlich	2450	—	n.b.	
21	frisch, süßlich	2506	—	n.b.	
22	süßlich, blumig, frisch	2922	—	n.b.	
23	süßlich, blumig	>2800	>2800	n.b.	
24	süßlich, blumig, Blüten	>2800	>2800	n.b.	
25	Blüten, stechend	>2800	>2800	n.b.	
26	süßlich	>2800	>2800	n.b.	
27	süßlich, blumig, Seife	>2800	>2800	n.b.	

#	Geruchseindruck	KI GC/O HP- Innowax	KI GC/MS HP- Innowax	Strukturvorschlag	Geruch Lit.
28	süßlich, fruchtig, Blüten	>2800	>2800	n.b.	
29	Butter, süßlich	>2800	>2800	n.b.	
30	fettig, ölig	>2800	>2800	n.b.	

n.b.: keine sichere Zuordnung möglich, <sup>1</sup>(Le Guen *et al.* 2000), <sup>2</sup>(Culleré *et al.* 2004), <sup>3</sup>(Chin *et al.* 2011), <sup>4</sup>(San-Juan *et al.* 2010), <sup>5</sup>(Zimmermann und Schieberle 2000), <sup>6</sup>(Guedes *et al.* 2004), <sup>7</sup>(Komes *et al.* 2006)

Durch Vergleich der Massenspektren und der ermittelten Kováts-Indizes mit denen authentischer Standards und Literaturdaten wurden zwölf Aromastoffe identifiziert (Tabelle 2.41; Anhang 7.2 und 7.3).

*Tabelle 2.41: Mittels GC/MS identifizierte geruchsaktive Substanzen des flüssig/flüssig Extraktes der Kultivierung von I. benzoinum mit ungehopfter Bierwürze (7 h) mit Literaturvergleichswerten*

Substanz	KI HP-Innowax			KI DB-5MS		
	GC/MS*	Standard	Lit.	GC/MS*	Standard	Lit.
Propan-1-ol	1043	1042	1045 <sup>1</sup>	<800	<800	558 <sup>9</sup>
5-Methylheptan-3-on	1190	1182	1200 <sup>2</sup>	945	944	948 <sup>10</sup>
Essigsäure	1452	1452	1434 <sup>1</sup>	<800	<800	660 <sup>11</sup>
Furfural	1465	1477	1458 <sup>1</sup>	<800	834	832 <sup>12</sup>
Isobuttersäure	1569	1560	1584 <sup>3</sup>	<800	<800	793 <sup>13</sup>
Buttersäure	1628	1617	1644 <sup>3</sup>	<800	<800	821 <sup>14</sup>
2-Furanmethanol	1661	1665	1669 <sup>4</sup>	857	860	866 <sup>9</sup>
3-Methylbuttersäure	1670	1661	1660 <sup>5</sup>	844	856	840 <sup>5</sup>
1,4-Dioxan-2-ol	1774	n.b. *	n.b. +	898	n.b. *	n.b. +
2-Phenylethanol	1906	1901	1902 <sup>7</sup>	1112	1115	1118 <sup>6</sup>
Maltol	1956	1953	1961 <sup>6</sup>	1106	1117	1110 <sup>13</sup>
Zimtaldehyd	2034	2024	2032 <sup>8</sup>	1274	1285	1266 <sup>15</sup>
4-Vinylguaiacol	2191	2208	2200 <sup>1</sup>	1309	1310	1313 <sup>16</sup>

\* authentischer Standard nicht erhältlich, + keine Literaturwerte vorhanden, n.b.: keine sichere Zuordnung möglich, <sup>1</sup>(Lee und Noble 2003), <sup>2</sup>(Körtvélyesi *et al.* 2001), <sup>3</sup>(Ferreira *et al.* 2001), <sup>4</sup>(Yanagimoto *et al.* 2004), <sup>5</sup>(Ong und Acree 1999), <sup>6</sup>(Schnermann und Schieberle 1997), <sup>7</sup>(Varming *et al.* 2004), <sup>8</sup>(Lee *et al.* 2005), <sup>9</sup>(Leffingwell und Alford 2005), <sup>10</sup>(Flach *et al.* 2004), <sup>11</sup>(Chung *et al.* 1993), <sup>12</sup>(Machiels *et al.* 2003), <sup>13</sup>(Zimmermann und Schieberle 2000), <sup>14</sup>(Zehentbauer und Reineccius 2002), <sup>15</sup>(Pino *et al.* 2005), <sup>16</sup>(El-Sayed *et al.* 2005)

## 2.2.5 Fermentation von ungehopfter Bierwürze durch *T. chioneus*

Bei der gaschromatographisch-olfaktometrischen Untersuchung (5.3.2.2) des aus der Biotransformation von ungehopfter Bierwürze durch *T. chioneus* erhaltenen Aromaextraktes wurden 28 verschiedene geruchsaktive Substanzen detektiert und in mindestens drei voneinander unabhängigen Läufen wahrgenommen (Abbildung 2.33, Tabelle 2.42).

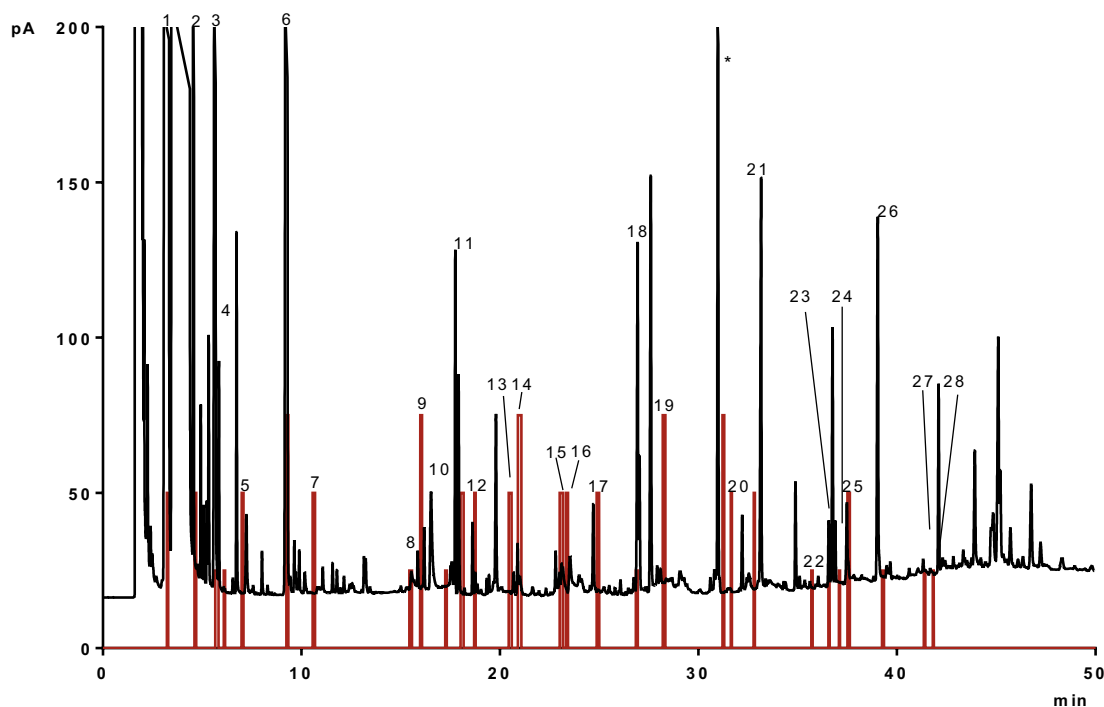


Abbildung 2.33: GC/FID/O-Chromatogramm der Kultivierung von *T. chioneus* mit ungehopfter Bierwürze (TCH<sub>BWZ<sub>u</sub></sub>, 17 h) mit FID- (schwarz) und ODP-Spur (rot); \* = Interner Standard

Tabelle 2.42: Übersicht über die olfaktorisch wahrgenommenen Substanzen der Kultivierung von *T. chioneus* mit ungehopfter Bierwürze (TCH<sub>BWZ<sub>u</sub></sub>, 17 h) zusammen mit den zugehörigen Koväts-Indizes der Probe (KI), dem MS-Strukturvorschlag sowie dem Literaturgeruchseindruck

#	Geruchseindruck	KI GC/O HP- Innowax	KI GC/MS HP- Innowax	Strukturvorschlag	Geruch Lit.
1	süßlich, fruchtig	892		n.b.	
2	fruchtig, muffig	965		n.b.	
3	süßlich, säuerlich, Alkohol	1039	1041	Propan-1-ol	fruchtig, Plastik <sup>1</sup>
4	säuerlich	1048	1051	2-Ethyl-2-methyl- 1,3-dioxolan	
5	säuerlich, Alkohol, muffig	1086	1090	2-Methylpropan-1-ol	grün, bitter <sup>2</sup>

#	Geruchseindruck	KI GC/O HP- Innowax	KI GC/MS HP- Innowax	Strukturvorschlag	Geruch Lit.
6	Alkohol, säuerlich	1187	1189	5-Methylheptan-3-on	
7	vergoren, muffig, säuerlich	—	1235	n.b.	
8	muffig, Essig	1442	1453	Essigsäure	Essig <sup>3</sup>
9	Kartoffel, erdig	1456	1465	Furfural	Holz, süß <sup>3</sup>
10	süßlich	1497	1520	Benzaldehyd	verbrannter Zucker, Mandel <sup>4</sup>
11	blumig, süßlich	1527	1539	Propionsäure	stechend, sauer, Käse, Butter, Himbeere, Erdbeere, Cognac <sup>9</sup>
12	süßlich	1558	1569	Isobuttersäure	Käse <sup>3</sup>
13	süßlich, pilzig, muffig	1650	1661	2-Furanmethanol	verbrannt, schweißig <sup>5</sup>
14	Schweiß, Käse	1657	1670	3-Methylbuttersäure	Käse <sup>3</sup>
15	blumig, Honig	1748	1759	Phenyllessigsäure-methylester	Honig <sup>6</sup>
16	blumig	1763	1774	n.b.	
17	fruchtig, muffig	1839	1850	n.b.	
18	süßlich	1943	1956	Maltol	karamelartig <sup>7</sup>
19	süßlich, Gebackenes	2008	2028	Furaneol	Zuckerwatte <sup>3</sup>
20	rauchig	2203	2192	4-Vinylguaiacol	rauchig, würzig, geräuchert <sup>8</sup>
21	süßlich, blumig	2263	2279	n.b.	
22	süßlich, muffig, säuerlich	2452	2467	n.b.	
23	süßlich, würzig	2511	2529	n.b.	
24	süßlich, blumig	2532	2549	n.b.	
25	süßlich, fruchtig	2571	2587	n.b.	
26	fruchtig, süßlich, muffig	2638	2694	n.b.	
27	süßlich	>2800	>2800	n.b.	
28	süßlich, säuerlich	>2800	>2800	n.b.	

n.b.: keine sichere Zuordnung möglich, <sup>1</sup>(Le Guen *et al.* 2000), <sup>2</sup>(San-Juan *et al.* 2010), <sup>3</sup>(Culleré *et al.* 2004), <sup>4</sup>(Valim *et al.* 2003), <sup>5</sup>(Chin *et al.* 2011), <sup>6</sup>(Steinhaus und Schieberle 2000), <sup>7</sup>(Zimmermann und Schieberle 2000), <sup>8</sup>(Komes *et al.* 2006), <sup>9</sup>(Schrader *et al.* 2004)



Durch den Vergleich der gaschromatographischen und massenspektrometrischen Daten mit authentischen Standards sowie mit Literaturdaten wurden 14 geruchsaktive Substanzen identifiziert (Tabelle 2.43; Anhang 7.2 und 7.3). Ein authentischer Standard von 2-Ethyl-2-methyl-1,3-dioxolan war nicht käuflich erwerbbar.

*Tabelle 2.43: Mittels GC/MS identifizierte geruchsaktive Substanzen des flüssig/flüssig Extraktes der Kultivierung von T. chioneus mit ungehopfter Bierwürze (TCH<sub>BWZu</sub>, 17 h) mit Literaturvergleichswerten*

Substanz	KI HP-Innowax			KI DB-5MS		
	GC/MS	Standard	Lit.	GC/MS	Standard	Lit.
Propan-1-ol	1041	1042	1045 <sup>1</sup>	<800	<800	558 <sup>7</sup>
2-Ethyl-2-methyl-1,3-dioxolan	1051	n.b. *	n.b. +	<800	n.b. *	n.b. +
2-Methylpropan-1-ol	1090	1092	1085 <sup>2</sup>	<800	<800	653 <sup>11</sup>
5-Methylheptan-3-on	1189	1182	1200 <sup>3</sup>	945	944	948 <sup>12</sup>
Essigsäure	1453	1452	1434 <sup>2</sup>	<800	<800	660 <sup>13</sup>
Furfural	1465	1477	1458 <sup>2</sup>	<800	834	832 <sup>14</sup>
Benzaldehyd	1520	1531	1524 <sup>4</sup>	966	964	967 <sup>15</sup>
Propionsäure	1539	1523	1523 <sup>2</sup>	<800	<800	816 <sup>16</sup>
Isobuttersäure	1569	1560	1584 <sup>5</sup>	<800	<800	793 <sup>16</sup>
2-Furanmethanol	1661	1665	1669 <sup>6</sup>	858	860	866 <sup>7</sup>
3-Methylbuttersäure	1670	1661	1660 <sup>8</sup>	843	856	840 <sup>8</sup>
Phenylelessigsäure-methylester	1759	1775	1754 <sup>9</sup>	1177	1181	1179 <sup>17</sup>
Maltol	1956	1953	1961 <sup>10</sup>	1110	1117	1110 <sup>16</sup>
Furaneol	2028	2019	2020 <sup>8</sup>	<800	1056	1058 <sup>18</sup>
4-Vinylguaiacol	2192	2208	2200 <sup>2</sup>	1309	1310	1313 <sup>19</sup>

\* authentischer Standard nicht erhältlich, + keine Literaturwerte vorhanden, n.b.: keine sichere Zuordnung möglich, <sup>1</sup>(Le Guen *et al.* 2000), <sup>2</sup>(Lee und Noble 2003), <sup>3</sup>(Körtvélyesi *et al.* 2001), <sup>4</sup>(Valim *et al.* 2003), <sup>5</sup>(Ferreira *et al.* 2001), <sup>6</sup>(Yanagimoto *et al.* 2004), <sup>7</sup>(Leffingwell und Alford 2005), <sup>8</sup>(Ong und Acree 1999), <sup>9</sup>(Karlsson *et al.* 2009), <sup>10</sup>(Schnermann und Schieberle 1997), <sup>11</sup>(Adedeji *et al.* 1991), <sup>12</sup>(Flach *et al.* 2004), <sup>13</sup>(Chung *et al.* 1993), <sup>14</sup>(Machiels *et al.* 2003), <sup>15</sup>(Setzer *et al.* 2006), <sup>16</sup>(Zimmermann und Schieberle 2000), <sup>17</sup>(Pino *et al.* 2005), <sup>18</sup>(Zehentbauer und Reineccius 2002), <sup>19</sup>(El-Sayed *et al.* 2005)

## 2.2.6 Fermentation von ungehopfter Bierwürze durch *W. cocos*

Bei der gaschromatographisch-olfaktometrischen Analyse (5.3.2.2) des Aromaextraktes aus der Fermentation von ungehopfter Bierwürze durch *W. cocos* (25 h) wurden 27 verschiedene geruchsaktive Substanzen detektiert (Abbildung 2.34, Tabelle 2.44), die in mindestens drei voneinander unabhängigen Läufen wahrgenommen wurden.

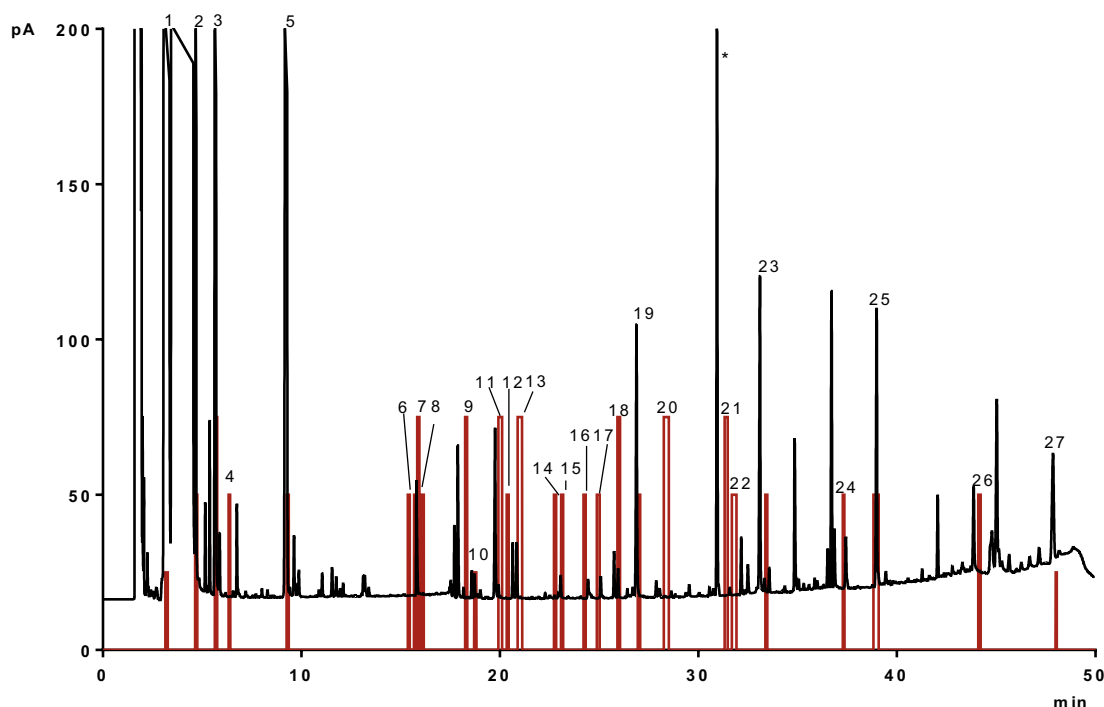


Abbildung 2.34: GC/FID/O-Chromatogramm der Kultivierung von *W. cocos* mit ungehopfter Bierwürze ( $WCO_{BWZu}$ , 25 h) mit FID- (schwarz) und ODP-Spur (rot); \* = Interner Standard

Tabelle 2.44: Übersicht über die olfaktorisch wahrgenommenen Substanzen der Kultivierung von *W. cocos* mit ungehopfter Bierwürze ( $WCO_{BWZu}$ , 25 h) zusammen mit den zugehörigen Koväts-Indizes der Probe (KI), dem MS-Strukturvorschlag sowie dem Literaturgeruchseindruck

#	Geruchseindruck	KI GC/O HP- Innowax	KI GC/MS HP- Innowax	Strukturvorschlag	Geruch Lit.
1	süßlich	896		n.b.	
2	süßlich, frisch, blumig	992		n.b.	
3	süßlich, fruchtig	1045	1046	Propan-1-ol	fruchtig, Plastik <sup>1</sup>
4	säuerlich, Alkohol	1089	1093	2-Methylpropan-1-ol	grün, bitter <sup>2</sup>
5	süßlich, Alkohol	1186	1191	5-Methylheptan-3-on	
6	muffig	1412	1424	n.b.	
7	Alkohol, fruchtig, säuerlich		1444	n.b.	
8	Essig	1439	1452	Essigsäure	Essig <sup>3</sup>
9	muffig	1450	1465	n.b.	

#	Geruchseindruck	KI GC/O HP- Innowax	KI GC/MS HP- Innowax	Strukturvorschlag	Geruch Lit.
10	blumig	1537	1552	Linalool	fruchtig, grün, süß <sup>4</sup>
11	süßlich, blumig, frisch	1555	1569	Isobuttersäure	Käse <sup>3</sup>
12	muffig, säuerlich	1613	1629	Buttersäure	Käse <sup>3</sup>
13	muffig	1647	1662	2-Furanmethanol	verbrannt, schweißig <sup>5</sup>
14	Schweiß	1656	1670	3-Methylbuttersäure	Käse <sup>3</sup>
15	muffig, säuerlich	1745	1769	n.b.	
16	süßlich, blumig, frisch	1759	1774	1,4-Dioxan-2-ol	
17	fruchtig, blumig	1806	1823	n.b.	
18	holzig, süßlich, würzig	1857	1873	Benzylalkohol	blumig, Trockenfrüchte <sup>6</sup>
19	Blüten, Rosen	1890	1906	2-Phenylethanol	Rose <sup>2</sup>
20	süßlich, blumig	1939	1956	Maltol	karamelartig <sup>7</sup>
21	süßlich, Zuckerwatte	2009	2028	Furaneol	Zuckerwatte <sup>3</sup>
22	würzig, rauchig	2205	2192	4-Vinylguaiacol	rauchig, würzig, geräuchert <sup>8</sup>
23	süßlich, würzig	2308	2330	n.b.	
24	fruchtig, süßlich	2529	2550	Phenylelessigsäure	Honig, blumig <sup>9</sup>
25	fruchtig, süßlich	2670	2694	n.b.	
26	süßlich, säuerlich, fruchtig	>2800	>2800	n.b.	
27	süßlich	>2800	>2800	n.b.	

n.b.: keine sichere Zuordnung möglich, <sup>1</sup>(Le Guen *et al.* 2000), <sup>2</sup>(San-Juan *et al.* 2010), <sup>3</sup>(Culleré *et al.* 2004), <sup>4</sup>(Choi 2003), <sup>5</sup>(Chin *et al.* 2011), <sup>6</sup>(Fang und Qian 2005), <sup>7</sup>(Zimmermann und Schieberle 2000), <sup>8</sup>(Komes *et al.* 2006), <sup>9</sup>(Escudero *et al.* 2007)

Anhand des Vergleiches der Kováts-Indizes und Massenspektren mit authentischen Standards und Literaturdaten wurden 16 Aromastoffe identifiziert (Tabelle 2.45; Anhang 7.2 und 7.3). 1,4-Dioxan-2-ol wurde aufgrund eines nicht erhältlichen authentischen Standards nur vorläufig identifiziert.

Tabelle 2.45: Mittels GC/MS identifizierte geruchsaktive Substanzen des flüssig/flüssig Extraktes der Kultivierung von *W. cocos* mit ungehopfter Bierwürze ( $WCO_{BWZu}$ , 25 h) mit Literaturvergleichswerten

Substanz	KI HP-Innowax			KI DB-5MS		
	GC/MS*	Standard	Lit.	GC/MS*	Standard	Lit.
Propan-1-ol	1046	1042	1045 <sup>1</sup>	<800	<800	558 <sup>7</sup>
2-Methylpropan-1-ol	1093	1092	1085 <sup>2</sup>	<800	<800	658 <sup>12</sup>
5-Methylheptan-3-on	1191	1182	1200 <sup>3</sup>	945	944	948 <sup>13</sup>
Essigsäure	1452	1452	1434 <sup>2</sup>	<800	<800	660 <sup>9</sup>
Linalool	1552	1545	1544 <sup>2</sup>	1099	1101	1101 <sup>14</sup>
Isobuttersäure	1569	1560	1584 <sup>4</sup>	<800	<800	793 <sup>15</sup>
Buttersäure	1629	1617	1628 <sup>5</sup>	<800	<800	821 <sup>16</sup>
2-Furanmethanol	1662	1665	1669 <sup>6</sup>	857	860	866 <sup>7</sup>
3-Methylbuttersäure	1670	1661	1686 <sup>5</sup>	844	856	840 <sup>8</sup>
1,4-Dioxan-2-ol	1774	n.b. *	n.b. +	898	n.b. *	n.b. +
Benzylalkohol	1873	1889	1837 <sup>9</sup>	1036	1087	1043 <sup>17</sup>
2-Phenylethanol	1906	1901	1902 <sup>10</sup>	1112	1115	1118 <sup>11</sup>
Maltol	1956	1953	1961 <sup>11</sup>	1106	1117	1110 <sup>15</sup>
Furaneol	2028	2019	2020 <sup>8</sup>	1054	1056	1058 <sup>16</sup>
4-Vinylguaiaicol	2192	2208	2200 <sup>2</sup>	1310	1310	1313 <sup>17</sup>
Phenylelessigsäure	2550	2548	2571 <sup>4</sup>	1242	1246	1274 <sup>5</sup>

\* authentischer Standard nicht erhältlich, + keine Literaturwerte vorhanden, n.b.: keine sichere Zuordnung möglich, <sup>1</sup>(Le Guen *et al.* 2000), <sup>2</sup>(Lee und Noble 2003), <sup>3</sup>(Körtvélyesi *et al.* 2001), <sup>4</sup>(Ferreira *et al.* 2001), <sup>5</sup>(Valim *et al.* 2003), <sup>6</sup>(Yanagimoto *et al.* 2004), <sup>7</sup>(Leffingwell und Alford 2005), <sup>8</sup>(Ong und Acree 1999), <sup>9</sup>(Chung *et al.* 1993), <sup>10</sup>(Varming *et al.* 2004), <sup>11</sup>(Schnermann und Schieberle 1997), <sup>12</sup>(Adedeji *et al.* 1991), <sup>13</sup>(Flach *et al.* 2004), <sup>14</sup>(Setzer *et al.* 2006), <sup>15</sup>(Zimmermann und Schieberle 2000), <sup>16</sup>(Zehentbauer und Reineccius 2002), <sup>17</sup>(El-Sayed *et al.* 2005)

## 3 Diskussion

### 3.1 GC/O und GC/MS in der Aromaanalytik

Die gewonnenen Aromaextrakte der Substrat- und Pilzblindwerte sowie der Fermentationen wurden mittels GC/O untersucht. Die GC/O ist das Mittel der Wahl zur Aufklärung aromaaktiver Komponenten in der komplexen Matrix eines Lebensmittels (d'Acampora Zellner *et al.* 2008; Plutowska und Wardencki 2008).

Die erstmals von Fuller *et al.* (1964) veröffentlichte Technik zur Wahrnehmung von Aromastoffen durch einen modifizierten Gaschromatographen (Abbildung 3.1) ermöglicht die gleichzeitige sensorische Bewertung einer eluierenden Substanz durch die selektive, hoch sensible menschliche Nase und die konventionelle Detektion (d'Acampora Zellner *et al.* 2008; Plutowska und Wardencki 2008). In der vorliegenden Untersuchung wurde ein Flammenionisationsdetektor verwendet. Später wurde diese Technik durch die Anfeuchtung des Gasstroms von Dravnieks und O'Donnell (1971) optimiert.



Abbildung 3.1: Gaschromatograph mit Flammenionisationsdetektor und Olfactory Detection Port (ODP)

Olfaktometrische Analysen müssen ungestört in einem ruhigen Raum durchgeführt werden. Der verwendete ODP muss so angebracht werden, dass die sensorische Bewertung in einer komfortablen Haltung durchgeführt werden kann (Delahunty *et al.* 2006). Während der Analysen müssen zur Gewährleistung valider Ergebnisse die Zimmertemperatur, die physiologische und psychologische Gesundheit des Riechers sowie auch der Zustand der Extrakte kontrolliert werden (Abbott *et al.* 1993; Delahunty *et al.* 2006). Das Make-up-Gas (Luft) muss mit einem Fluss von mindestens  $50 \text{ mL min}^{-1}$  verwendet, da dies sowohl die Detektionsfrequenz als auch die Intensität der Wahrneh-

mung beeinflusst (Hanaoka *et al.* 2000). Da die Atemfrequenz Einfluss auf die Detektion von Aromastoffen hat, wurden die Extrakte während dieser Untersuchung mehrfach abgerochen (Hanaoka *et al.* 2001). Zusätzlich wurde auf Rauchen sowie Trinken und Essen von stark aromatisierten Lebensmitteln mindestens eine Stunde vor der Olfaktometrie verzichtet. Am Tag der Olfaktometrie wurden zusätzlich keine Parfüms oder stark riechende Deodorants verwendet (Delahunty *et al.* 2006).

Die sensorischen Fähigkeiten von Menschen unterscheiden sich signifikant und so werden die gleichen Wahrnehmungen auf unterschiedliche Weise beschrieben. Auch die Geruchsschwellen können innerhalb der Wahrnehmung einer Person sowie zwischen verschiedenen Personen stark abweichen (d'Acampora Zellner *et al.* 2008; Delahunty *et al.* 2006). Damit die individuellen sensorischen Fähigkeiten nur geringen Einfluss auf die vorliegende Untersuchung nahmen, wurden die olfaktometrischen Analysen der Biotransformationen der Reststoffe von mindestens zwei Personen bewertet sowie jeweils mehrfach abgerochen.

Die gewonnenen Extrakte wurden in Doppelbestimmung gaschromatographisch-massenspektrometrisch an einer polaren Säule (HP-Innowax) sowie an einer unpolaren Säule (DB-5MS) analysiert. Die erhaltenen Chromatogramme wurden Peak für Peak den zweispurigen (FID- und ODP-Spur) GC/O Chromatogrammen gegenübergestellt. Bei einigen Peaks war eine eindeutige Substanzidentifizierung nicht möglich. Die Aromastoffe wurden mit Hilfe von authentischen Standards und den geräteunabhängigen Retentionsindizes nach Kováts (1958) bestätigt. Geringe Abweichungen zwischen den Retentionsindizes der Verbindungen innerhalb der analysierten Extrakte zu den Standardsubstanzen sind auf Säulenwechsel oder auf Matrixeffekte der verwendeten Substrate zurückzuführen.

Die Auswertung der GC/O-Ergebnisse gestaltete sich häufig schwierig, da die Fläche des Peaks meist nicht mit der Geruchsintensität korrelierte (d'Acampora Zellner *et al.* 2008; Delahunty *et al.* 2006). Einige wahrgenommene Substanzen konnten keinem MS-Strukturvorschlag zugeordnet werden. Grund hierfür könnte ein niedriger Geruchsschwellenwert der geruchsaktiven Substanz sein, die zwar olfaktorisch wahrgenommen wurde, deren Konzentration aber für eine zuverlässige Substanzidentifizierung mittels GC/MS zu niedrig war (d'Acampora Zellner *et al.* 2008).

Die Quantifizierung der Aromastoffe erfolgte mit Hilfe des Internen Standards Thymol. Eine elegantere, aber kostspieligere Methode stellt die Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) dar. Stabilisotopenmarkierte Interne Standards besitzen identische chemische Eigenschaften. Dadurch werden Verluste während der Aufarbeitung und Chromatographie

kompensiert. Die Standards müssen aber meist synthetisiert werden, da sie häufig nicht käuflich zu erwerben sind (Schieberle und Molyneux 2012).

### 3.2 Biotransformation von Nebenströmen der Lebensmittelindustrie zu hochwertigen Aromaextrakten

In mit Reststoffen supplementierten Medien wurden 30 Basidiomyceten submers kultiviert. Der jeweilige Reststoff diente als einzige Kohlenstoffquelle für den Basidiomyceten. Bei zehn Stamm/Substrat-Kombinationen wurden ansprechende Geruchseindrücke verzeichnet, die signifikant verschieden zu ihren korrespondierenden Substrat- und Pilz-Blindwerten waren. Hierbei wurde eine große Bandbreite von Geruchseindrücken von blumig, fruchtig zu nussig festgestellt. Mit fünf Substraten (Waffelbruch, Teigbruch, Kakaopulver, Apfeltrester und Weintresterpresskuchen) wurden sensorisch ansprechende Kultivierungen gewonnen.

Mit Kakaoschalen und Kaffeegrund hingegen wurden keine vielversprechenden Stamm/Substrat-Kombinationen identifiziert. Beide Substrate werden aktuell von den Lebensmittelproduzenten thermisch entsorgt. Die Produktion von Fruchtkörpern des Austernseitlings *Pleurotus ostreatus* war mit Zugabe von Kakaoschalen, allerdings nicht als einzige Kohlenstoffquelle, möglich (Bermúdez *et al.* 2001; Pettipher 1987). Auch der Einsatz als Futtermittel ist nur als Beigabe möglich (Aregheore 2002).

Kaffeegrund wird in der Literatur als Beigabe zu Tierfuttermitteln, als Substrat für die emergente Kultivierung von *Pleurotus*-Spezies sowie zur Extraktion von phenolischen Verbindungen beschrieben (Fan *et al.* 2000; Mussatto *et al.* 2011; Pinelo *et al.* 2007; Xu *et al.* 2007). Kaffeegrund erwies sich als schlechtes Substrat für die Produktion von MaitakeFruchtkörpern (Barreto *et al.* 2008).

Mikroorganismen sind in der Lage biotische Zwischenprodukte in einer einstufigen (Biotransformation) oder mehrstufigen Reaktion (Biokonversion) zu wertvollen Aromakomponenten umzusetzen. Hierbei wird die Aktivität von konstitutiven und induzierbaren Enzymen der verwendeten Mikroorganismen genutzt (Berger 1995). Bei den zwei beschriebenen Substraten (Kakaoschalen und Kaffeegrund) waren entweder keine nutzbaren Zwischenprodukte vorhanden oder das Substrat war für die Kultivierung der verwendeten Pilze als alleinige Kohlenstoffquelle nicht geeignet.

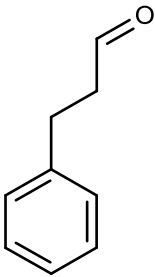
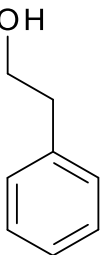
Die zehn ermittelten Stamm/Substrat-Kombinationen (Tabelle 2.1) zeigten das große Potenzial der Biotransformation von Reststoffen. Bei den ausgewählten

Biotransformationen wurden diejenigen Kultivierungen weiterverfolgt, welche am ansprechendsten sowie am intensivsten sensorisch wahrgenommen wurden.

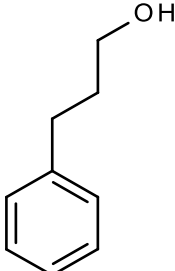
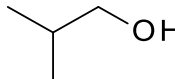
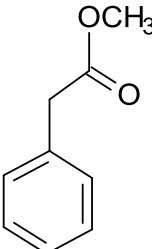
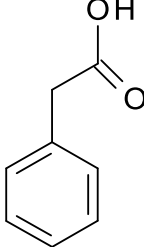
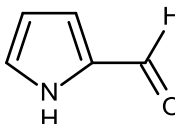
### 3.2.1 Biotransformation von unbehandeltem Weintresterpresskuchen durch *T. chioneus*

Bei der gaschromatographisch-olfaktometrischen Untersuchung des Aromaextraktes der Biotransformation von Weintresterpresskuchen durch *T. chioneus* wurden 17 geruchsaktive Substanzen wahrgenommen und neun Aromastoffe identifiziert. Als Hauptaromakomponenten der Kultivierung von *T. chioneus* mit Weintresterpresskuchen wurden mittels AEVA 3-Phenylpropanal (FD: 1024, A: 98) und 3-Phenylpropanol (FD: 16, A: 11) identifiziert (Tabelle 3.1). Analoge Ergebnisse wurden bei der Biotransformation von Apfeltrester durch *T. chioneus* gezeigt (2.1.6.1). Diese Biotransformationsprodukte wiesen in dieser Kultivierung die charakteristischen Geruchseindrücke blumig und fruchtig auf, welche sich mit den Literaturdaten grün, blumig sowie süß, blumig deckten (Lee *et al.* 2008; von Ranson und Belitz 1992). Das Biotransformationsprodukt Phenylelessigsäuremethylester, welches bereits im Destillat von *Gloeophyllum odoratum* identifiziert wurde (Rösecke *et al.* 2000), beeinflusste das Aroma dieser Kultivierung mit einem FD von 32 und einem Aromawert A von zwei.

Tabelle 3.1: Hauptaromakomponenten der Biotransformation von unbehandeltem Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer) durch *T. chioneus* mit den Geruchseindrücken und den Strukturformeln

Substanz	Geruchseindruck	Strukturformel
3-Phenylpropanal	süßlich, schwer, Pflaume, Trompetenbaumblüten	
2-Phenylethanol	blumig, Flieder, Rose	



Substanz	Geruchseindruck	Strukturformel
3-Phenylpropanol	süßlich, frisch	
2-Methylpropan-1-ol	süßlich, säuerlich	
Phenyllessigsäure-methylester	süßlich, schwer, blumig, muffig	
Phenyllessigsäure	süßlich, verbrannt	
1H-Pyrrrol-2-carboxaldehyd	süßlich, Vanille, Gebäck, Zwiebel	

Die Vorstufe der gebildeten Biotransformationsprodukte war Zimtsäure (2.1.6.5). Im Trester von weißen Rebsorten sind eine Vielzahl unterschiedlicher phenolischer Säuren zu finden (Kammerer *et al.* 2004). In den Schalen von Trauben der Rebsorte Merzling wurden Gesamtgehalte an phenolischen Säuren von bis zu 227,0 mg (kg TM)<sup>-1</sup> nachgewiesen. Die Kerne der Rebsorte Müller-Thurgau enthielten bis zu 326,6 mg (kg TM)<sup>-1</sup> phenolische Säuren (Kammerer *et al.* 2004).

2-Phenylethanol beeinflusste aufgrund des starken Abbaus dieses Aromastoffes (WT<sub>uBW</sub> = 488 µg L<sup>-1</sup>Kultur, TCH<sub>WTu</sub> = 41 µg L<sup>-1</sup>Kultur) während der Kultivierung nicht das Aroma dieser Biotransformation (FD: 512, A: <1).

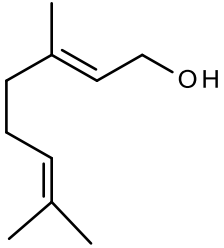
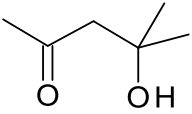
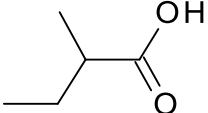
2-Methylpropan-1-ol (FD: 64, A: <1), welches auch in Submerskulturen von *Laetiporus sulphureus* identifiziert wurde (Krings *et al.* 2011) beeinflusst nicht das Aroma. 1H-Pyrrrol-2-carboxaldehyd (FD 64), eine flüchtige Komponente in Kakaopulver und dunkler Schokolade (Counet *et al.* 2002; Krings *et al.* 2006), trug zum blumigen, süßlichen, fruchtigen Gesamteindruck der Biotransformation von Weintresterpresskuchen durch *T. chioneus* bei. Phenyllessigsäure (FD: 128, A: <1) trug nicht zum Gesamtaroma bei. Krings *et al.* (1996) zeigten die Bildung von Phenyllessigsäure bei der Biokonversion von L-Phenylalanin durch *I. benzoinum* zu Benzaldehyd und 3-Phenylpropanol.

Das Aromamodell bestätigte die ermittelten Hauptaromakomponenten. Des Weiteren fehlte ein zusätzlicher würziger Geruchseindruck des Aromaextraktes, welcher bei den Kulturbrühen nicht wahrnehmbar war. Die Intensität des Geruchseindrucks bei der Rekonstruktion in Pentan/Diethylether war geringer als der Aromaextrakt.

### 3.2.2 Biotransformation von unbehandeltem Weintresterpresskuchen durch *W. cocos*

Bei der gaschromatographisch-olfaktometrischen Untersuchung des aus der Biotransformation von Weintresterpresskuchen durch *W. cocos* erhaltenen Aromaextraktes wurden 17 geruchsaktive Substanzen wahrgenommen und acht Aromastoffe identifiziert. Als Hauptaromakomponente wurde 2-Phenylethanol (FD: 1024, A: 15) mittels AEVA identifiziert (Tabelle 3.2). Im Substratblindwert wurde 2-Phenylethanol mit deutlich geringerem Gehalt ( $518 \mu\text{g L}^{-1}$  Kulturbrühe) nachgewiesen. Dieser Aromastoff ist eine Hauptaromakomponente der Weine aus der Rebsorte Gewürztraminer (Guth 1997). Während der Kultivierung kam es zu einer Vervierfachung des Gehalts an 2-Phenylethanol ( $2.074 \mu\text{g L}^{-1}$  Kulturbrühe). 2-Phenylethanol ist eine in Basidiomyceten häufig vorkommende, flüchtige Komponente und wurde bereits in Kulturüberständen von *Armillaria mellea*, *Grifola frondosa*, *Hericius erinaceus*, *Kuehneromyces mutabilis*, *Lentinula edodes*, *Meripilus giganteus*, *Pholiota squarrosa*, *P. sapidus*, *Polyporus* sp., *Polyporus tumulosus*, *Tyromyces floriformis* und *Tyromyces sambuceus* mit Gehalten von bis zu  $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$  nachgewiesen (Abraham und Berger 1994). Gallois *et al.* (1990) identifizierten in 18 von 25 Basidiomycetenstämmen 2-Phenylethanol mit Gehalten von bis zu  $250 \mu\text{g L}^{-1}$  Kultur. Auch in dem bekannten Zuchtchampignon *Agaricus bisporus* wurde 2-Phenylethanol gefunden (Venkateshwarlu *et al.* 1999).

Tabelle 3.2: Hauptaromakomponenten der Biotransformation von unbehandeltem Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer) durch *W. cocos* mit den Geruchseindrücken und den Strukturformeln

Substanz	Geruchseindruck	Strukturformel
(E)-Geraniol	süßlich, blumig, schwer	
2-Phenylethanol	Tabelle 3.1	
4-Hydroxy-4-methylpentan-2-on	Erdnuss, Nuss, geröstet	
2-Methylbuttersäure	Käse	

Auch (E)-Geraniol beeinflusste das Aroma dieser Kultur mit einem FD-Faktor von acht und einem Aromawert von vier. Ong und Acree (1999) wiesen 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  Geraniol in Wein der Rebsorte Gewürztraminer nach und diese Komponente beeinflusste das Aroma mit einem Aromawert von vier ähnlich der Biotransformation des Weintresterpresskuchens durch *W. cocos*. Die Fermentation des Weintresterpresskuchens führte zu einer Bildung von 159  $\mu\text{g L}^{-1}$  (E)-Geraniol. Kahlos *et al.* (1994) wiesen sowohl bei Plattenkultivierung als auch bei Submerskultivierung von *Gloeophyllum odoratum* Geraniol nach. Dieses Ergebnis wurde von Rösecke *et al.* (2000) bestätigt.

Eine bisher nicht identifizierte Substanz, die als süßlich, schwer, kräuterig, würzig wahrgenommen wurde, beeinflusste mit einem FD von 64 zusätzlich das Aroma. 4-Hydroxy-4-methylpentan-2-on (FD: 64, A: < 1) und 2-Methylbuttersäure (F: 64, A: < 1) tragen aufgrund ihres geringen Aromawertes trotz der hohen FD-Faktoren nicht zum Gesamtgeruchseindruck der Kultur bei. 4-Hydroxy-4-methylpentan-2-on wurde von Abraham und Berger (1994) in Konzentrationsbereichen von bis zu 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  in den Kulturüberständen von *Armillaria mellea*, *Meripilus giganteus*, *Pholiota populnea*, *Grifola frondosa* und *Ganoderma applanatum* identifiziert. 2-Methylbuttersäure mit ihrem charakteristischen Geruch nach Käse ist maßgeblich am Aroma der Früchte von *Viburnum opulus*, dem gewöhnlichen Schneeball, beteiligt (Kraujalyte *et al.* 2012; San-Juan *et al.* 2010). Dieser Aromastoff rief bei der olfaktometrischen Analyse eines Extraktes von

Kakaopulver, gewonnen mittels Dünnschicht-Hochvakuum-Destillation, starke sensorische Eindrücke hervor (Krings *et al.* 2006).

Um die Bildung der Aromastoffe im Kulturverlauf (Tag 0-10) zu ermitteln, wurden jeden Tag Proben der Kultivierung von *W. cocos* mit dem Substrat unbehandelter Weintresterpresskuchen entnommen, mittels HS-SPME extrahiert und gaschromatographisch-massenspektrometrisch analysiert. Mittels HS-SPME der Kulturen von *W. cocos* mit dem Substrat unbehandelter Weintresterpresskuchen wurden zahlreiche Verbindungen nachgewiesen, die in dem flüssig/flüssig-Extrakt dieser Kultivierung nicht identifiziert wurden.

Die zwei Hauptaromakomponenten 2-Phenylethanol und (*E*)-Geraniol wurden im Kulturverlauf gebildet (Abbildung 3.2). Die höchsten Gehalte dieser zwei Komponenten wurden an Tag sechs festgestellt. Dieser Kulturtag wurde auch bei der kulturbegleitenden, sensorischen Analyse als Zeitpunkt für den Kulturabbruch ausgewählt. *Bjerkandera adusta* bildete 2-Phenylethanol aus der Vorstufe L-Phenylalanin (Lapadatescu *et al.* 2000). Lapadatescu *et al.* (2000) postulierten, dass die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) L-Phenylalanin zu (*E*)-Zimtsäure desaminiert. (*E*)-Zimtsäure wird dann zu  $\alpha$ -Hydroxyphenylpropionsäure und Phenylbrenztraubensäure oxidiert. Phenylbrenztraubensäure wird zu Phenylacetaldehyd decarboxyliert. Aus Phenylacetaldehyd wird reversibel 2-Phenylethanol gebildet.

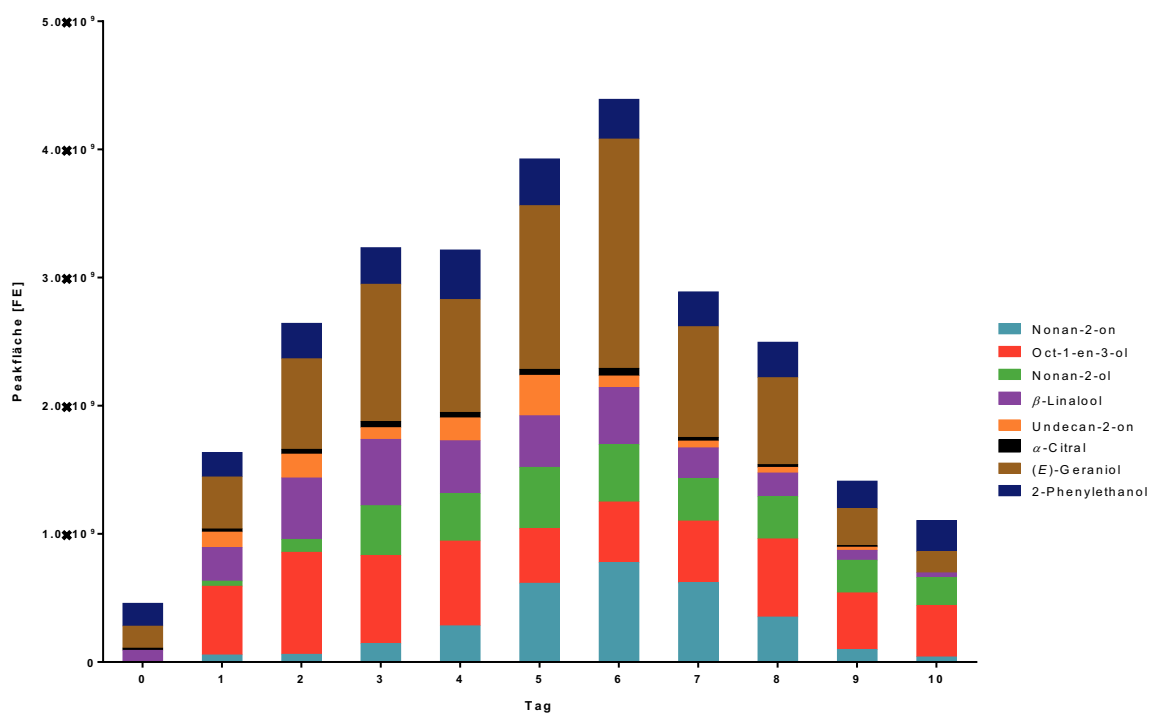


Abbildung 3.2: Bildung von ausgewählten flüchtigen Verbindungen im Kulturverlauf (Tag 0-10) von *W. cocos* mit unbehandeltem Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer)

Die Gehalte an 2-Phenylethanol und (*E*)-Geraniol könnten durch die enzymatische Freisetzung aus ihren glykosidisch gebunden Vorstufen entstanden sein. Der Saft aus der Rebsorte Gewürztraminer besaß  $3356 \mu\text{g L}^{-1}$  gebundenes und  $218 \mu\text{g L}^{-1}$  freies Geraniol (Gunata *et al.* 1985). 2-Phenylethanol lag mit  $159 \mu\text{g L}^{-1}$  gebunden und mit  $37 \mu\text{g L}^{-1}$  frei im Traubensaft vor (Gunata *et al.* 1985). Der Einsatz sogenannter „Aromaenzyme“ ist in der Weinherstellung üblich. Diese Enzympräparate enthalten z. B. Pektinasen, Hemicellulasen und  $\beta$ -Glucosidasen. Der Einsatz dieser Enzyme führte zu einer höheren Konzentration von Monoterpenen im Wein der Rebsorte Gewürztraminer (Rusjan *et al.* 2009). Gueguen *et al.* (1997) setzten immobilisierte  $\beta$ -Glucosidasen bei der Herstellung von Muskatwein ein und zeigten eine deutliche Zunahme an Nerol, Geraniol, Linalool,  $\gamma$ -Terpinen, 2-Phenylethanol und Benzylalkohol in diesem Wein. Basidiomyceten besitzen ein cellulolytisches System bestehend aus Endoglucanasen, Cellobiohydrolasen und  $\beta$ -Glucosidasen.  $\beta$ -Glucosidasen, die aus unterschiedlichen Pilzen isoliert wurden, weisen große strukturelle Variabilität auf, die teilweise ihren intra- oder extrazellulären Ursprung widerspiegeln. Die identifizierten Proteine bewegen sich im Massenbereich von 35 bis 640 kDa. (Baldrian und Valášková 2008). Zwei Braun- und vier Weißfäulepilze wurden auf *Eucalyptus grandis* Holzchips als Festbettfermentation kultiviert. Hier zeigte *W. cocos* bereits nach 15 Tagen deutlich höhere  $\beta$ -Glucosidase-Aktivitäten mit  $8,3 \pm 0,5 \text{ IU Kultur}^{-1}$  im Vergleich zu den anderen eingesetzten Pilzen. Jede Kultur enthielt 200 mL eines 2% Malzextrakt-Agars mit 50 g *Eucalyptus grandis* Holzchips. Die Enzymaktivität wurde als Gesamtaktivität nach zwei Extraktionen mit Natriumacetatpuffer mit 0,01% Tween 80 ermittelt (Machuca und Ferraz 2001).

Im Zuge der Kultivierung von *W. cocos* mit dem Substrat Weintresterpresskuchen bildete sich  $\alpha$ -Muurolen, Linalool, Octan-3-ol, Nonan-2-on, Undecan-2-on, Nonan-2-ol,  $\beta$ -Cadinen, Decan-2-on,  $\beta$ -Ocimen, Undecan-2-ol, Citral und Phenylessigsäuremethylester.  $\alpha$ -Muurolen und  $\beta$ -Cadinen wurden in der Kulturbrühe von *Coprinus cinereus* nachgewiesen. Hierbei bildete die Terpen-Synthase Cop 3  $\alpha$ -Muurolen, während Cop 1 und Cop 2 die Bildung von  $\beta$ -Cadinen katalysieren (Agger *et al.* 2009).  $\alpha$ -Muurolen wurde in den Basidiomyceten *Poria subacida* und *Fomitopsis pinicola* nachgewiesen (Gallois *et al.* 1990; Rösecke *et al.* 2000).  $\beta$ -Cadinen wurde in den Fruchtkörpern von *Piptoporus betulinus* und *Fomitopsis pinicola* nachgewiesen (Rösecke *et al.* 2000).

Linalool wurde mit Gehalten von  $100\text{--}200 \mu\text{g L}^{-1}$  in den Kulturen von *Lenzites betulina* und *Poria subvermispora* identifiziert. In geringen Mengen wurde Nonan-2-on mit seinem Geruch nach Blauschimmelkäse in *Vararia effusata* nachgewiesen (Gallois *et al.* 1990).

Oct-1-en-3-ol als C8-Verbindung wurde in zahlreichen Kulturen und Fruchtkörpern nachgewiesen (Abraham und Berger 1994; Gallois *et al.* 1990; Piovano *et al.* 2009; Rösecke *et al.* 2000).

Undecan-2-on wurde in Macromyceten nachgewiesen (Ristoiu *et al.* 2009). Nonan-2-ol ist ein Aromastoff von Fischsaucen, fermentierten Sojapasten und -saucen sowie unterschiedlichen Reissorten mit einem olfaktometrisch bestimmten Geruch nach Kokosnuss, Wachs und Gurke. Decan-2-on wurde sowohl in Basmatireis als auch in Jasminreis olfaktometrisch bestimmt (Yang *et al.* 2008; Giri *et al.* 2010).

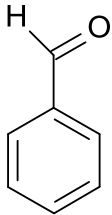
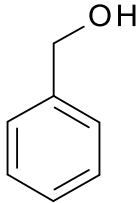
In geringen Mengen von bis zu  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  wurde Phenylelessigsäuremethylester in den Submerskulturen von *Nigroporus durus*, *Polyporus tumulosus*, *Lenzites frabea*, *Phellinus contiguus*, *Polyporus betulinus*, *Polyporus frondosus*, *Poria subacida* und *Poria subvermispora* identifiziert (Abraham und Berger 1994; Gallois *et al.* 1990).

### 3.2.3 Biotransformation von Apfeltrester durch *T. chioneus*

Insgesamt wurden 14 Aromakomponenten mittels GC/O im flüssig/flüssig Extrakt in mindestens drei unabhängigen Läufen nachgewiesen. Sieben Aromastoffe wurden durch den Vergleich der Kováts-Indizes und Massenspektren mit denen der Datenbank NIST 2008 MS LIB und Literaturwerten identifiziert und mit Hilfe von authentischen Standards bestätigt.

Durch eine AEVA wurden für alle gefundenen Aromastoffe FD-Faktoren ermittelt und 3-Phenylpropanal (FD: 128, A: 94) als Hauptaromakomponente identifiziert (Tabelle 3.3). 3-Phenylpropanal wurde als grün und blumig beschrieben (von Ranson und Belitz 1992). Neben 3-Phenylpropanol trug Benzylalkohol (FD: 32, A: 17) maßgeblich zum Aroma der Kultur bei. Benzylalkohol besitzt einen blumigen und fruchtigen Geruch (Culleré *et al.* 2004; Fang und Qian 2005). Der Einfluss der Essigsäure auf das Aroma ist vernachlässigbar, da der Aromawert unter eins lag (Grosch 1994).

Tabelle 3.3: Hauptaromakomponenten der Biotransformation von Apfeltrester durch *T. chioneus* mit den Geruchseindrücken und den Strukturformeln

Substanz	Geruchseindruck	Strukturformel
Benzaldehyd	Apfel, süßlich, fruchtig	
3-Phenylpropanal	süßlich, schwer, blumig, reifer Apfel, reife Pflaume, Trompetenbaumbblüte	Tabelle 3.1
Benzylalkohol	süßlich, Vanille, Zimt	
3-Phenylpropanol	süßlich, Karamell, Zimt	Tabelle 3.1

3-Phenylpropanal, Benzylalkohol und 3-Phenylpropanol (FD: 8, A: 30) wurden im Zuge der Biotransformation gebildet und prägten den süßlichen, pflaumenmusartigen Geruch. Während 3-Phenylpropanol und Benzylalkohol bereits bekannte Biotransformationsprodukte unterschiedlicher Basidiomyceten sind, wurde 3-Phenylpropanal bisher noch nicht als Aromastoff von Ständerpilzen beschrieben. Dieser Aromastoff wurde zum Beispiel in dem Kohlwildtypen *Brassica insularis* in Spuren und im Rosenapfel nachgewiesen (Wong und Lai 1996; Breme *et al.* 2009). Der Basidiomycet *B. adusta* baut L-Phenylalanin, katalysiert durch die PAL, zu (*E*)-Zimtsäure ab, welche weiter zu Phenylbrenztraubensäure, Phenylelessigsäure, Mandelsäure und  $\alpha$ -keto-Phenylelessigsäure umgesetzt wird (Lapadatescu *et al.* 2000). Vergleichbar desaminierte *I. benzoinum* L-Phenylalanin und reduzierte Zimtsäure zu 3-Phenylpropanol (Krings *et al.* 1996). Nach Nimura *et al.* (2010) produziert *Schizopyllum commune* Zimtaldehyd, Zimtalkohol und 3-Phenylpropanol, wenn dem Medium nach einer Kulturdauer von drei Tagen Zimtsäure zugegeben wurde. *Tyromyces palustris* und *Gloeophyllum trabeum* disproportionierten Benzaldehyd zu Benzylalkohol und Benzoessäure (Kamada *et al.* 2002).

Benzaldehyd mit seinem Bittermandelaroma (Valim *et al.* 2003) ist ein typischer Metabolit von Basidiomyceten und ist zusätzlich ein wichtiger Bestandteil des Apfeltresteraromas. In Apfeltrester wird Benzaldehyd durch die Hydrolyse von Amygdalin, welches in den Samen vorkommt, gebildet (Madrera und Valles 2011). Farnesen mit seinem süßlich, blumigen Geruchseindruck ist das vorherrschende Terpen, welches während der Lagerung von Äpfeln entsteht (Huelin und Murray 1966; Meigh und Filmer 1969). Madrera und Valles (2011) beschreiben diesen Aromastoff als süßlich und holzig.

*T. chioneus* bildete ein komplexes Aromastoffgemisch mit Benzaldehyd,  $\alpha$ -Farnesen, 3-Phenylpropanal, Benzylalkohol und 3-Phenylpropanol, wenn der Pilz in einem Medium mit Apfeltrester als einziger Kohlenstoffquelle kultiviert wurde. Im Vergleich dazu produzierte *Ceratocystis fimbriata* in einem apfeltresterhaltigen Medium einfache Aromastoffe wie Ethanol, Ethylacetat, Ethylpropionat und Isoamylacetat (Bramorski *et al.* 1998).

Das Aromamodell der Hauptaromakomponenten dieser Biotransformation in Pentan/Diethylether (1:1,12 v/v) bestätigte die ermittelten FD-Faktoren und Aromawerte. Nur ein würziger und rosinenartiger Geruchseindruck sowie eine geringere Intensität unterschieden das Aromamodell von dem Aromaextrakt. Die ermittelten Gehalte an Aromakomponenten wurden mit Hilfe des Internen Standards Thymol quantifiziert. Genauere Resultate werden durch die SIVA erreicht (Schieberle und Molyneux 2012).

Um die Bildung der Aromastoffe im Kulturverlauf (Tag 0-8) zu verfolgen, wurden jeden Tag Proben der Kultivierung von *T. chioneus* mit dem Substrat lyophilisierter Apfeltrester entnommen und mittels HS-SPME-GC/MS analysiert. Im Zuge des Kulturverlaufes wurde Benzaldehyd teilweise abgebaut, während der Gehalt an 3-Phenylpropanal stetig zunahm (Abbildung 3.3).



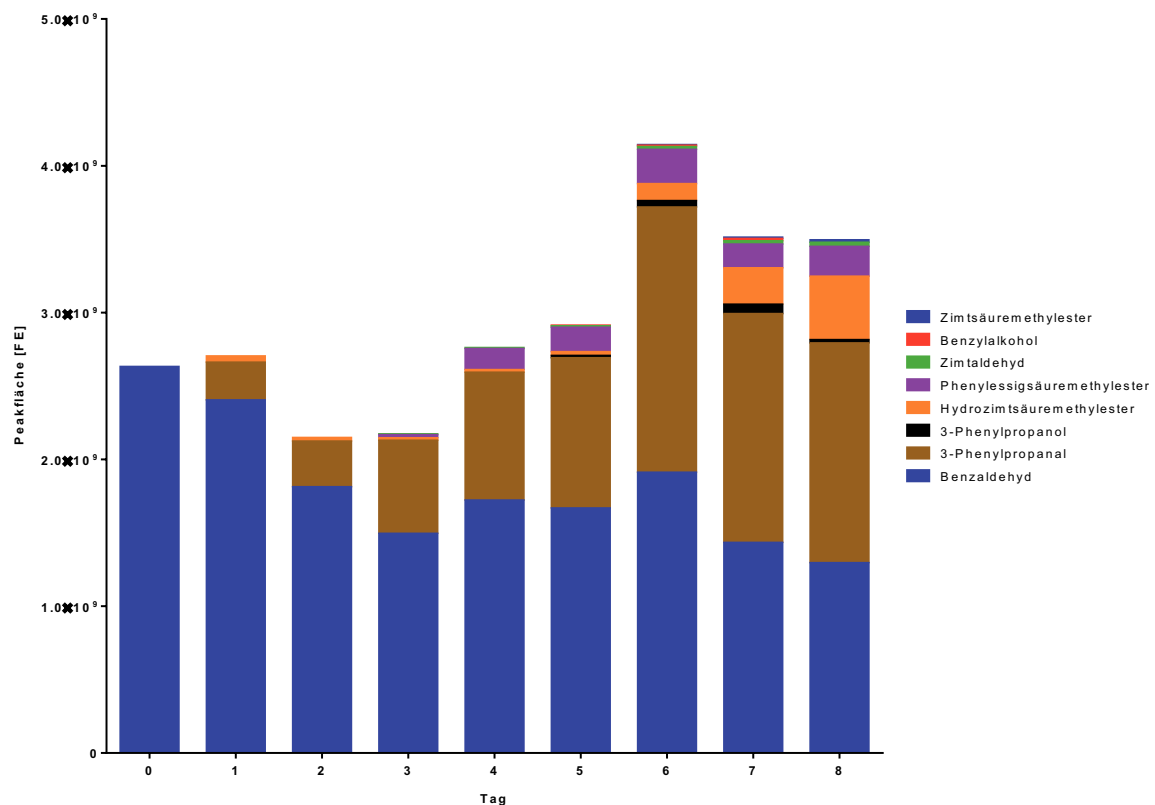


Abbildung 3.3: Bildung von benzoiden und phenylpropanoiden Verbindungen im Kulturverlauf (Tag 0-8) von *T. chioneus* mit lyophilisiertem Apfeltrester

Van den Ban *et al.* (1999) supplementierten eine Submerskultur des thermophilen Bakteriums *Pyrococcus furiosus* mit Zimtaldehyd. Die Arbeitsgruppe postulierte, dass die Bildung des Aldehyds 3-Phenylpropanal über die Sättigung der Doppelbindung erfolgt. 3-Phenylpropanal wird dann zu 3-Phenylpropanol reduziert. 3-Phenylpropanal wurde allerdings in den Submerskulturen nicht nachgewiesen. Benzaldehyd wurde durch *P. furiosus* zu Benzylalkohol reduziert. In dem hier untersuchten Kulturmedium von *T. chioneus* mit Apfeltrester wurden Benzylalkohol und 3-Phenylpropanol ab Tag vier mittels flüssig/flüssig-Extraktion und ab Tag fünf mittels HS-SPME in Spuren nachgewiesen.

Des Weiteren wurden Hydrozimtsäuremethylester, Zimtsäuremethylester, Zimtaldehyd und Phenyllessigsäuremethylester nachgewiesen. Hydrozimtsäuremethylester wurde in gekochten Fruchtkörpern von *Tricholoma matsutake* gefunden und Phenyllessigsäuremethylester in den Extrakten der Fruchtkörper von *Gloeophyllum odoratum* (Cho *et al.* 2006; Rösecke *et al.* 2000). Zimtaldehyd trägt zum bitteren und würzigen Aroma des Medizinalpilzes *Hericium erinaceus*, auch *pom pom mushroom* genannt, bei (Abraham und Berger 1994). Bis zu  $250 \mu\text{g L}^{-1}$  Zimtsäuremethylester wurden

in den Kulturbrühen von *Lenzites frabea*, *Poria subvermispora*, *Hirschioporus pergamenus*, *Poria subacida* und *Vararia effusata* abhängig von der Medienzusammensetzung gefunden (Gallois *et al.* 1990).

### 3.2.3.1 Supplementierung des Nährmediums mit potenziellen Vorstufen der Biotransformationsprodukte von Apfeltrester durch *T. chioneus*

Um den Einfluss von potenziellen Präkursoren der Aromastoffe zu untersuchen, wurde dem Medium (*E*)-Zimtsäure (1 mM) zugesetzt. Als Referenz diente das Medium M2. Nach erfolgter Biotransformation wurde die Kultur flüssig/flüssig extrahiert und gaschromatographisch analysiert.

Die Zugabe von (*E*)-Zimtsäure führte zu einer zehnfach höheren Bildung der Hauptaromastoffe 3-Phenylpropanal und 3-Phenylpropanol. Zusätzlich wurden in den mit (*E*)-Zimtsäure dotierten Kulturen 2-Phenylethanol, Maltol und Zimtaldehyd nachgewiesen.

Die Massenspektrometrie bietet die Möglichkeit, die Genese von Aromastoffen mit Hilfe von Markierungsexperimenten mit stabilisotopenmarkierten Standards aufzuklären (Schieberle 2005). Um (*E*)-Zimtsäure als Präkursor zu bestätigen sowie den Biogeneseweg von 3-Phenylpropanal, Zimtaldehyd und 3-Phenylpropanol zu untersuchen, wurde (*E*)-D<sub>7</sub>-Zimtsäure direkt in das Referenzmedium supplementiert. Die Massenspektren von 3-Phenylpropanal, Zimtaldehyd und 3-Phenylpropanol aus der Biotransformation von Apfeltrester durch *T. chioneus* im Medium M25, dem (*E*)-D<sub>7</sub>-Zimtsäure zugesetzt wurde, wiesen die Markierungsgrade von 95%, 100% und 98% auf. Es handelte sich bei der (*E*)-D<sub>7</sub>-Zimtsäure also um die Vorstufe des 3-Phenylpropanals, Zimtaldehyds und 3-Phenylpropanols. Ein möglicher Biosyntheseweg, der sich aus den Supplementierungsversuchen ergibt, ist in Abbildung 3.4 dargestellt.

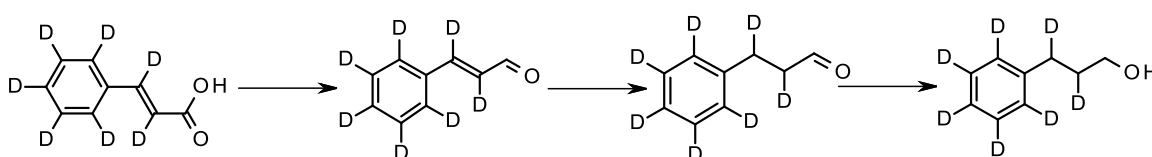


Abbildung 3.4: Postulierter Biosyntheseweg von 3-D<sub>7</sub>-Phenylpropanal und 3-D<sub>7</sub>-Phenylpropanol aus (*E*)-D<sub>7</sub>-Zimtsäure über D<sub>7</sub>-Zimtaldehyd

(*E*)-Zimtsäure wurde zum korrespondierenden Aldehyd reduziert, die C<sub>α</sub>-C<sub>β</sub>-Doppelbindung des Aldehyds hydriert und der Aldehyd zum Alkohol reduziert. Die genannten Metabolite des postulierten Biosyntheseweges wurden alle in der mit (*E*)-D<sub>7</sub>-Zimtsäure supplementierten Kulturen identifiziert. Die Reaktionsschritte des postulierten Biosynthesewegs müssen noch in Folgestudien untersucht werden. Ein ähnlicher Biosyntheseweg von Zimtsäure über Zimtaldehyd, Zimtalkohol zu

3-Phenylpropanol wurde bereits beim Weißfäulepilz *Schizophyllum commune* gezeigt (Nimura *et al.* 2010).

Diese Reaktionswege werden hauptsächlich von zwei Klassen von Enzymen, den Aldehydoxidoreduktasen bzw. Formaldehydoxidoreduktasen sowie den Alkoholdehydrogenasen, katalysiert (van den Ban *et al.* 1999). Die Reduktion von aromatischen Säuren und die Freisetzung von Aldehyden im Zuge des Ligninabbaus wurde bereits berichtet (Jong *et al.* 1994; Kirk und Farrell 1987). Zahlreiche Weißfäulepilze sind in der Lage, Arylsäuren zu den korrespondierenden Alkoholen und Aldehyden zu reduzieren. Hierbei wird der Schritt vom Aldehyd zum Alkohol durch die NADPH-abhängige Arylalkoholdehydrogenase katalysiert. Die im Zuge des Abbaus von Lignin entstehenden sekundären Metabolite, Arylaldehyde und -alkohole, dienen als Substrat für die extrazelluläre Arylalkoholoxidase (AAO), die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produziert (Ferreira *et al.* 2010; Hage *et al.* 1999).

Einige reduktive Enzyme sind bisher in Basidiomyceten untersucht worden. Bislang wurden bereits Chinon-Reduktasen identifiziert, wie die 1,4-Benzochinonreduktase, die Chinone zu Hydrochinone über ein Ping-Pong-Fließgleichgewicht reduziert (Ander und Marzullo 1997; Brock *et al.* 1995; Brock und Gold 1996; Qi und Jellison 2004). Auch in dem Braunfäulepilz *Gloeophyllum trabeum* wurden zwei Chinonreduktasen identifiziert. Diese Reduktasen bilden zum einen Hydroxylradikale über einen Redoxkreislauf zwischen den zwei extrazellulären Metaboliten 2,5-Dimethoxyhydrochinon und 2,5-Dimethoxy-1,4-benzochinon und zum anderen halten sie das intrazelluläre Gleichgewicht zwischen dem toxischen 2,5-Dimethoxy-1,4-benzochinon und dem nicht toxischen 2,5-Dimethoxyhydrochinon aufrecht (Cohen *et al.* 2004). Ähnliche Ergebnisse wurden von Jensen *et al.* 2002 gezeigt. NADH:Chinon-Oxidoreduktaseaktivität wurde ebenfalls in *Trametes versicolor* beschrieben (Lee *et al.* 2007). In dem Pilz *Cryptococcus flavus* wurde eine Xylosereduktase nachgewiesen, die D-Xylose NADPH-abhängig zu Xylitol reduziert (Mayr *et al.* 2003). Die Aktivität einer aromatischen Nitroreduktase wurde in Extrakten von *Phanerochaete chrysosporium* nachgewiesen, welche die Reduktion von Nitrogruppen von 1,3-Dinitrobenzol, 2,4-Dinitrotoluol, 2,4,6-Trinitrotoluol, 1-Chloro-2,4-dinitrobenzol und 2,4-Dichloro-1-nitrobenzol zu den korrespondierenden Hydroxylaminen und/oder Aminen katalysierte (Rieble *et al.* 1994).

Eine Aldehydoxidoreduktase wurde bisher noch nicht aus Basidiomyceten isoliert. Ganzzellkulturen des gram-negativen Bakteriums *Nocardia* sp. NRRL 5646 reduzierten Carbonsäuren zu den Aldehyden und Alkoholen durch die Carbonsäurereduktase und Aldehydreduktase. Die Alkohole werden dann in die korrespondierenden Acetylerster durch die Acyltransferasen überführt (Li und Rosazza 2000). Li und Rosazza (1997)

reinigten und charakterisierten diese  $163 \pm 3,8$  kDa große Aldehydoxidoreduktase, die in der Lage war, zahlreiche Arylcarbonsäuren, wie substituierte Benzoesäuren, phenyl-substituierte aliphatische Säuren, heterozyklische Carbonsäuren und polyaromatische Carbonsäuren, zu den korrespondierenden Aldehyden zu reduzieren.

### 3.2.4 Optimierung der Medien der Biotransformationen von unbehandeltem Weintresterpresskuchen und Apfeltrester durch *T. chioneus*

Um die Verwendung von Weintrester als Ersatz zu Weintresterpresskuchen zu untersuchen, wurde entsprechend der Kultivierung von *W. cocos* mit Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer, Neustadt/Weinstraße) ein Weintrester (Gewürztraminer, Gengenbach/Baden) als Substrat genutzt. Das Substrat wurde lyophilisiert ( $WT_g$ ) und unbehandelt ( $WT_{gu}$ ) eingesetzt.

Die Biotransformation von  $WCO_{WT_{gu}}$  führte wie bei der Kultivierung des Weintresterpresskuchens durch *W. cocos* (2.1.5) zur Bildung von 2-Phenylethanol und (*E*)-Geraniol. Zusätzlich wurde die Bildung von Linalool detektiert. Der durch das sensorische Panel evaluierte Gesamtgeruchseindruck dieser Kultur war kongruent mit der Kultivierung mit Weintresterpresskuchen als Substrat. Ein Austausch des Presskuchens durch den Trester ist demnach möglich. Des Weiteren führte der Einsatz dieser Rebsorte aus zwei unterschiedlichen Anbaugebieten in dieser Untersuchung zu keiner signifikanten Veränderung der relevanten Aromastoffe sowie des Gesamtgeruchseindrucks der Kultivierung.

Die Kultivierung von *W. cocos* mit lyophilisiertem Weintrester (Gengenbach;  $WCO_{WT_g}$ ) wies ähnliche Gehalte an 2-Phenylethanol und eine gesteigerte Bildung von (*E*)-Geraniol auf. Zusätzlich wurden Phenylelessigsäuremethylester, Octan-3-ol, Linalool und Undecan-2-ol nachgewiesen. Der sensorische Eindruck war vergleichbar zu der Biotransformation von unbehandeltem Weintrester aus Baden. Da die Zellstruktur durch das Gefriertrocknen deutlich angegriffen wird, sind die Präkursoren für *W. cocos* so eventuell leichter zugänglich.

Um die Medienrezeptur kostengünstiger und einfacher zu gestalten, wurden die Gehalte einzelner Komponenten reduziert. Dazu wurde der Einfluss der zugesetzten Spurenelement- und Vitaminlösungen auf die Aromastoffproduktion untersucht. Um die Bildung der Biotransformationsprodukte zu steigern, wurde dem Medium Glucose-Monohydrat als zusätzliche Kohlenstoffquelle zugesetzt. Zusätzlich wurden die chemisch

definierten Stickstoffquellen (Ammoniumnitrat und Aspartat) durch komplexe Stickstoffquellen substituiert (Hefeextrakt, Sojapepton und Casein-Hydrolysat).

Die Biotransformationen von Apfeltrester und unbehandeltem Weintresterpresskuchen durch *T. chioneus* ohne Stickstoffquelle bzw. verringerter Menge der Stickstoffquelle führte bei allen Kultivierungen zu einer verminderten Bildung von 3-Phenylpropanal, während 3-Phenylpropanol und Phenylelessigsäuremethylester vermehrt gebildet wurden. Zusätzlich wurde in den Kulturen mit Apfeltrester Benzylalkohol vermehrt gebildet.

Elisashvili *et al.* (2008) zeigten, dass die Kultivierung von Basidiomyceten mit Fruchtrückständen zur Bildung von hydrolytischen Enzymen und Laccasen führte. Die Supplementierung von Stickstoff in Submerskulturen von *Trametes versicolor* mit Mandarinenschalen führte zu einer Verringerung der Manganperoxidaseaktivität (Elisashvili *et al.* 2008). D'Agostini *et al.* (2011) kultivierten *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes* und *Agaricus blazei* auf Sojabohnenschalen mit Zusatz von Harnstoff und Ammoniumsulfat, um Kohlenstoff/Stickstoff-Verhältnisse von 5, 15, 20 oder 30 zu erreichen. Hohe Kohlenstoff/Stickstoff-Verhältnisse steigerten das Biomassewachstum und verringerten die Produktion von Laccasen. Die untersuchten Basidiomyceten produzierten unter Zusatz von Harnstoff und Ammoniumsulfat höhere Laccaseaktivitäten. Kohlenstoff/Stickstoff-Verhältnisse unter 30 waren für die Prähydrolyse von Pflanzenrückständen durch die ausgewählten Basidiomyceten am besten, da das Wachstum verringert und die Laccaseexpression induziert wurde (D'Agostini *et al.* 2011). Das lignocellolytische Enzymsystem von Basidiomyceten benötigt  $H_2O_2$ , welches mit Hilfe des Enzyms AAO aus Arylalkoholen, aber auch spezifischen Arylaldehyden, zur Verfügung gestellt wird (Ferreira *et al.* 2010; Hage *et al.* 1999). Durch das Verringern bzw. Weglassen der Stickstoffquelle wurde vermutlich das lignocellolytische Enzymsystem der Kulturen verstärkt und somit der Verbrauch an Arylaldehyden und -alkoholen erhöht.

Der Austausch der chemisch definierten Stickstoffquelle durch komplexe Stickstoffquellen bei den Kulturen mit Apfeltrester führte zu einer geringeren Bildung von 3-Phenylpropanal, während es zu einer Produktion von 2-Phenylethanol sowie einer vermehrten Bildung von Phenylelessigsäuremethylester kam. Die Verwendung von Sojapepton und Casein-Hydrolysat führte zu einem deutlich veränderten Gesamtgeruchseindruck der Kulturen, die ihren typischen pflaumenartigen, süßlichen Geruch verloren. Dagegen führte die Verwendung von Hefeextrakt zu identischen Geruchseindrücken mit einer höheren Intensität.

Aus der Literatur ist bekannt, dass der Ursprung der verwendeten Stickstoffquellen (organisch oder anorganisch) das Myzelwachstum beeinflusst (Lin und Sung 2006).

Hierbei führen organische Stickstoffquellen zu einem höheren Myzelwachstum. Die verwendete Stickstoffquelle beeinflusste darüber hinaus auch die Produktion von Exopolysacchariden (Lin und Sung 2006). Kachlishvili *et al.* (2006) untersuchten den Einfluss von zusätzlichen Stickstoffquellen auf die Emerskultivierung auf Weizenstroh und Buchenlaub von vier Weißfäulepilzen (*Funalia trogii*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus dryinus* und *P. tuberregium*). Im Allgemeinen wurde mit der Supplementierung einer zusätzlichen Stickstoffquelle die Ausbeute an hydrolytischen Enzymen und Laccasen erhöht. Die gesteigerte Produktion führten die Autoren auf die Zunahme der Biomasse zurück. Nur die Xylanaseaktivität von *P. dryinus* und die Laccaseaktivität von *L. edodes* nahmen gegenüber dem Kontrollmedium bei dem Substrat Weizenstroh signifikant zu. Die Produktion von Manganperoxidasen wurde durch zusätzliche Stickstoffgabe (20 mM) unterdrückt.

Der Verzicht auf den Zusatz von Spurenelementen führte bei den Biotransformationen mit beiden Substraten zu einer geringeren Bildung der Hauptaromakomponente 3-Phenylpropanal. Zusammen mit dem Substrat Weintresterpresskuchen wurde vermehrt Phenylelessigsäure gebildet. Die Bildung der Biotransformationsprodukte war bei den Kulturen mit Apfeltrester ohne Spurenelementlösung am geringsten. Zusätzlich bewertete das sensorische Panel diese Kultivierung als säuerlich und dumpf. Kirk *et al.* (1986) versiebenfachten die Menge der zugesetzten Spurenelementlösung, welche analog zu der in dieser Arbeit verwendeten Spurenelement Lösung die Elemente Magnesium, Eisen, Kupfer und Zink enthielt. Der Zusatz dieser Spurenelementlösung führte zu einer 1,7-fachen Ligninaseaktivität. Die Ligninaseaktivität wurde anhand der Oxidation von Veratrylalkohol zu Veratrumaldehyd bestimmt. Jonathan und Fasidi (2001) untersuchten den Einfluss von Spurenelementen auf das Myzelwachstum von *Lentinus subnudus* und *Schizophyllum commune*. Die Spurenelemente Zink, Mangan und Eisen förderten das Wachstum signifikant und der Verzicht auf die Spurenelementlösung führte zu deutlich schlechterem Wachstum dieser Pilze. Auch Shutova *et al.* (2008) zeigten ein verbessertes Myzelwachstum von *Lentinus tigrinus* durch die Supplementierung von Kupfer sowie eine erhöhte Laccaseaktivität.

Die Kultivierung von *T. chioneus* im Medium ohne BME-Vitaminlösung resultierte analog zum Verzicht auf Spurenelementlösung in einer vermehrten Bildung von Phenylelessigsäure. Dies spiegelte sich aber nicht im Gesamtgeruchseindruck wider. Im Gegensatz dazu führte der Verzicht auf die BME-Vitaminlösung bei der Biotransformation von Apfeltrester zu Kulturen mit einer Rauchnote.

Durch den Verzicht auf eine Vitaminlösung kam es bei *Lentinus subnudus* und *Schizophyllum commune* zu einem verringerten Myzelwachstum. Das Myzelwachstum

nahm nach Zusatz von Biotin bei *L. subnudus* und nach Zusatz von Pyridoxin bei *S. commune* deutlich zu (Jonathan und Fasidi 2001).

In der vorliegenden Untersuchung führte die ausschließliche Kultivierung in suspendiertem Weintresterpresskuchen im Vergleich zum Referenzmedium M2 zu ähnlichen Gehalten an 3-Phenylpropanal sowie an 3-Phenylpropanol. Dabei war der Gesamtgeruchseindruck intensiver mit einer metallischen Note. Die Kultivierung ausschließlich im suspendierten Weintresterpresskuchen zeigt aber das Potenzial, mit Hefeextrakt als Stickstoffquelle und gezielten Gaben von Spurenelementen und Vitaminen ein kostengünstiges Medium für die Gewinnung der Aromastoffgemische zu entwickeln.

### 3.2.5 Maßstabsvergrößerung der Kultivierung von *T. chioneus* mit Apfeltrester

Die Maßstabsvergrößerung der Biotransformation von Apfeltrester durch *T. chioneus* war ohne größere Modifikationen möglich. Keine Unterschiede im sensorischen Gesamteindruck wurden zwischen den Maßstäben 4:1 (400 mL Medium M2) und 40:1 (4 L Medium M2) und der Referenzkultur im Maßstab 1:1 (100 mL Medium M2) festgestellt.

Die Kultivierung im Maßstab 40:1 wurde in einem Rührkesselreaktor durchgeführt. Fermentationen im Rührkesselreaktor werden von zahlreichen Faktoren, wie der Sauerstoffversorgung, dem verwendeten Gefäß sowie dem verwendeten Rührwerk beeinflusst. Auch ob ein *Batch* oder *Fed-batch*-Prozess verwendet wird, beeinflusst die Kultivierung im Bioreaktor (Tang und Zhu 2007). Eine Veränderung dieser Parameter bietet demnach das Potenzial zu einer weiteren Ausbeutesteigerung der Fermentation von Apfeltrester durch *T. chioneus*.

Stentelaire *et al.* (2000) untersuchten den Einfluss der Agitation und der Belüftung auf die Reduktion von Vanillinsäure zu Vanillin durch *Pycnoporus cinnabarinus*. Eine Belüftung von  $90 \text{ L h}^{-1}$  während der Wachstumsphase und eine geringere Belüftung von  $30 \text{ L h}^{-1}$  während der Produktionsphase führte zu einer Steigerung der Vanillinproduktion von  $831 \text{ mg L}^{-1}$  auf  $1.260 \text{ mg L}^{-1}$ . Zusätzlich wiesen die Autoren nach, dass die Produktion an Vanillin in einem mechanisch gerührten Bioreaktor im Vergleich zu einem ruhenden Reaktor höher war.

Durch eine *Fed-batch*-Fermentationsstrategie mit Glucose als Kohlenstoffquelle wurde die gleichzeitige Bildung von extrazellulären Polysacchariden und Ergosterol im Vergleich zu der *Batch*-Fermentation, um 26,9% und 17,2% gesteigert (Zou 2006). Shih *et al.* (2008)

zeigten ebenfalls eine signifikante Steigerung der Bildung von extrazellulären Polysacchariden bei *Grifola frondosa* durch eine *Fed-batch*-Fermentation mit Glucose.

Die Produktabtrennung stellt häufig die schwierigste Stufe im Bioprozess dar, insbesondere da Aromastoffe leicht flüchtig und schwer löslich sind. Zusätzlich ist es häufig notwendig, die Aromastoffe unter einer bestimmten Konzentration zu halten, um negative Effekte auf das mikrobielle Wachstum zu verhindern. Hierfür wurden zahlreiche *online*- und *offline*-Technologien für die Extraktion und Trennung entwickelt (Bluemke und Schrader 2001).

Konzentrationen von über  $1.000 \text{ mg L}^{-1}$  Vanillin wiesen toxische Effekte auf das Wachstum von *P. cinnabarinus* auf. Die Verwendung des Austauschharzes XAD-2 führte zu einer geringeren Konzentration des Produktes Vanillin in der Kulturbrühe von *P. cinnabarinus*. Durch den geringeren Gehalt an Vanillin in der Kulturbrühe wurde der toxische Effekt auf das Myzelwachstum verhindert. Zusätzlich wurde die Bildung unerwünschter Stoffe wie Methoxyhydrochinon verringert und Konzentrationen von  $1.575 \text{ mg L}^{-1}$  Vanillin erreicht (Stentelaire *et al.* 2000).

Die Kultivierung von *T. chioneus* mit Apfeltrester wurde im Maßstab 50:1 (5 L Medium M2) durchgeführt und der Kulturüberstand im Anschluss mittels Pervaporation gereinigt und konzentriert. Bei der Pervaporation handelt es sich um eine partielle Verdampfung einer flüssigen Mischung an einer permselektiven, nicht-porösen Membran (Karlsson und Trägårdh 1994; Vane 2005).

Die Aldehyde 3-Phenylpropanal und Benzaldehyd wurden selektiv über die Membran gereinigt und konzentriert. Der Alkohol 3-Phenylpropanol wurde nicht an der Membran getrennt und konzentriert. Benzylalkohol wurde in den Konzentrat- und Permeatproben nicht identifiziert. Lamer *et al.* (1996) zeigten in einem Modellsystem mit den Aromastoffen Benzaldehyd und Benzylalkohol bei gleicher Konzentration in wässriger Lösung, dass der Fluss für Benzaldehyd an der Anströmseite der Kompositmembran 50mal höher war als bei Benzylalkohol. Der Fluss wurde definiert als die Masse an Wasser und/oder organischer Komponente, die pro Quadratmeter und Stunde durch die Membran diffundiert. Auch lag die Selektivität bei gleicher Konzentration für Benzaldehyd bei 272 und für Benzylalkohol bei 2 (Lamer *et al.* 1996). Diese schlechte Trennung der Alkohole wurde auch in der vorliegenden Untersuchung beobachtet.

Zusätzlich kam es innerhalb der Pervaporationsanlage zu Verlusten an Aromastoffen. She und Hwang (2006) untersuchten die Pervaporationsausbeute an Hauptaromakomponenten in wässrigen Systemen von Apfelessenzen, Orangenaroma und



Destillaten des schwarzen Tees. Die Ergebnisse zeigten signifikante Verluste an Aromastoffen. Die Autoren empfahlen das Pervaporationsdesign sowohl hinsichtlich der Abdichtung, als auch der Probensammlung zu optimieren. Das verwendete Pervaporationssystem könnte hinsichtlich der Abdichtung sowie der Kühlung der Probenfalle verbessert werden, indem nicht mit einer Mischung von Isopropanol und Trockeneis gekühlt wird, sondern ähnlich der *Solvent-Assisted-Flavour-Evaporation-Unit* (SAFE) flüssiger Stickstoff eingesetzt wird, der eine deutlich niedrigere Temperatur aufweist (Engel *et al.* 1999). Eine Steigerung der Trennfaktoren ist durch eine Veränderung der Pervaporationsparameter möglich. Lamer *et al.* (1996) untersuchten die Kopplung eines Rührkesselreaktors bei der Kultivierung von *B. adusta* mit einer Pervaporationsanlage. Kulturbrühen weisen eine hohe Viskosität auf und benötigen hohe Flussraten für eine effektive Pervaporation (Lamer *et al.* 1996). Zusätzlich könnte der Feedtank auf 20 °C temperiert werden analog zu She und Hwang (2006). Die höhere Temperatur bei der vorliegenden Untersuchung kann zu den hohen Verlusten geführt haben. Auch eine direkte Koppelung des Fermenters mit der Pervaporationsanlage kann die Verluste minimieren.

### 3.3 Entwicklung neuartiger Getränke durch den Einsatz von essbaren Basidiomyceten

#### 3.3.1 Fermentierte Getränke

Fermentierte Lebensmittel sind Lebensmittelsubstrate, welche von essbaren Mikroorganismen kolonisiert und bewachsen werden. Die Enzyme der verwendeten Mikroorganismen hydrolysieren Polysaccharide, Proteine und Lipide zu nicht toxischen Produkten (z. B. Aromakomponenten), die für den Verbraucher ansprechend und attraktiv sind (Steinkraus 2009). Weltweit wird eine große Vielfalt unterschiedliche fermentierte, nicht alkoholische Getränke produziert (Tabelle 3.4). Teilweise sind die verwendeten Mikroorganismen dabei nicht bekannt. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um Bakterien und Hefen (Blandino *et al.* 2003; Dlusskaya *et al.* 2008; Mo *et al.* 2008; Prado *et al.* 2008).

Tabelle 3.4: Fermentierte, nicht alkoholische Getränke (Blandino *et al.* 2003; Dlusskaya *et al.* 2008; Mo *et al.* 2008; Prado *et al.* 2008; Kowalsky *et al.* 2011)

Produkt	Substrat	Mikroorganismus	Region
Bagni	Hirse	unbekannt	Kaukasus
Bionade®	Malz	<i>Gluconobacter oxydans</i>	Deutschland
Bioprofit®	Fruchtsaft	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG, <i>Propionibacterium freudenreichii</i>	Finnland
Boza	Weizen, Hirse, Mais und andere Cerealien	<i>Lactobacillus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Leuconostoc</i>	Albanien, Türkei, Rumänien, Bulgarien
Braga	Hirse	unbekannt	Rumänien
Busa	Reis oder Hirse	<i>Lactobacillus</i> , <i>Saccharomyces</i>	Syrien, Ägypten, Turkestan
Bushera	Sorghum oder Hirsemehl	<i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Streptococcus</i> . <i>L. brevis</i>	Uganda
Darassum	Hirse	unbekannt	Mongolei
Doro	Fingerhirsemalz	Hefen, Bakterien	Zimbabwe
Grainfields Wholegrain Liquid®	Getreide, Bohnen und Samen (z. B. Hafer, Mais, Reis, Luzernesamen)	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>S. boulardii</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Australien
Hardaliye	rote Trauben oder Traubensaft plus zerstoßene Senfsamen	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> , <i>L. casei</i> subsp. <i>pseudoplatanturum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. pontis</i> , <i>L. acetotolerans</i> , <i>L. sanfrancisco</i> , <i>L. vaccinostrercus</i> .	Türkei
Kaffir Bier	Sorghum	Hefen, Milchsäurebakterien	Südafrika

Produkt	Substrat	Mikroorganismus	Region
Kombucha	Tee	<i>Acetobacter xylinum</i> , <i>Bacterium gluconicum</i> <i>Schizosaccharomyces pombe</i> , <i>S. ludwigii</i> , <i>S. cerevisiae</i> , etc.	China, Russland, weltweit
Kwas	Malz, Roggenmehl, trockenes Roggenbrot, Saccharose	Milchsäurebakterien und <i>S. cerevisiae</i>	Russland
Mahewu	Maismehl, Weizenmehl, Hirsemalzmehl, Sorghummehl	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	Afrika, Golf- Region
Mangisi	Hirse	unbekannt	Zimbabwe
Munkoyo	Sorghum, Hirse oder Mais plus Wurzeln von <i>Rhynchosia heterophylla</i>	unbekannt	Afrika
Pozol	Mais	unbekannt	Mexiko
Proviva®	Hafermehlbrei	<i>L. plantarum</i>	Schweden
Rela®	Fruchtsaft	<i>L. reuteri</i> MM53	Schweden
Sojadrink	Soja	Milchsäurebakterien	China, Japan
Sorghum Bier	Sorghum, Mais	Hefen, Milchsäurebakterien	Südafrika
Thumba	Hirse	<i>Endomycopsis fibuliger</i>	Ostindien
Tobwa	Mais	Milchsäurebakterien	Zimbabwe
Togwa	Maismehl, Fingerhirsemalz, Cassavamehl	unbekannt	Afrika
Vita Biosä®	Kräuter und andere Pflanzen	Milchsäurebakterien	Dänemark

Die Verwendung von Basidiomyceten zur Herstellung von Getränken ist kein unbekanntes Konzept. Hierbei liegen die Schwerpunkte auf der Herstellung eines ethanolischen Getränkes, der Anreicherung mit gesundheitsförderlichen Komponenten (z. B. Polysaccharide) und der Nutzung von Pilzen, die in der traditionellen chinesischen Medizin Anwendung finden (Cho 2007; Osugi und Okamura 2001; Shi 2010; Takizawa *et al.* 2005; Wasser 2010; Yang und Zhang 2009; Yoshida *et al.* 2004). Die Aromatisierung von nicht alkoholischen Getränken durch die Fermentation mit Basidiomyceten wurde bisher noch nicht gezeigt.

### 3.3.2 Ungehopfte Bierwürze

Im Aromaextrakt der verwendeten, ungehopften Bierwürze wurden mittels GC/O 26 verschiedene Aromastoffe wahrgenommen und 14 Aromastoffe identifiziert. Die flüchtigen Komponenten Furfural, 2-Furanmethanol, 3-Methylbuttersäure, Essigsäure, 2-Methylpropan-1-ol und 4-Vinylguaiaicol wurden bereits zuvor in ungehopfter Bierwürze nachgewiesen (De Schutter *et al.* 2008a, 2008b; Hoff *et al.* 2012).

2-Furanmethanol und Furfural als Maillardprodukte entstehen im Zuge des Kochprozesses der Bierwürze (De Schutter *et al.* 2008b). Auch die für Bierwürze wichtige Aromakomponente 2-Phenylethanol wurde nachgewiesen (De Schutter *et al.* 2008a). 2-Phenylethanol wurde als eine essenzielle Aromakomponente von bayerischem Pils mit einem Aromawert von 15 identifiziert (Fritsch und Schieberle 2005).

Die rauchige Aromakomponente 4-Vinylguaiaicol, welche bei thermischen Prozessen durch die Decarboxylierung von Ferulasäure gebildet wird, wurde in der verwendeten Bierwürze identifiziert. Ihr Gehalt steigt im Zuge des Würzekochens an. Die enzymatische Genese dieser Aromakomponente ist aber in Folge der Fermentation zu Bier deutlich höher (Coghe *et al.* 2004a; De Schutter *et al.* 2008a; Komes *et al.* 2006).

Im Aromaextrakt wurden die geruchsaktiven Komponenten Phenylelessigsäure und 2-Methylpropanol identifiziert. Fritsch und Schieberle (2005) untersuchten das Aromaprofil von bayerischem Pils mittels AEVA. Hierbei wurde Phenylelessigsäure als eine der aromaktivsten Komponenten der sauren Fraktion des Aromaextraktes identifiziert. Zimtsäure wurde auch in torfigem Malz, welches in der Whiskeyherstellung Verwendung findet, identifiziert (Deki und Yoshimura 1974). 2-Methylpropanol wurde mit einem relativen FD-Faktor von 4 mittels Kopfraumanalyse von Pilsener Bier identifiziert (Fritsch und Schieberle 2005). Capronsäure mit ihrem charakteristischen käsigen Geruch wurde bereits in frischen Bieren mit unterschiedlichen Malzgehalten identifiziert (Culleré *et al.* 2004; Tsuji und Mizuno 2010).

Propan-1-ol, Buttersäure und Butan-2,3-diol wurden bisher noch nicht in ungehopften Bierwürzen beschrieben. Im Allgemeinen beeinflussten die Zusammensetzung der Bierwürze, das verwendete Malz sowie die Kochzeit, Kochtemperatur, Kochintensität und der pH-Wert die flüchtigen Komponenten von Bierwürzen (Hoff *et al.* 2012; De Schutter *et al.* 2008b).

Das verwendete Malz besitzt aufgrund des Röstgrades unterschiedliche Gehalte an Maillardprodukten, welche den Geschmack der hergestellten Bierwürze beeinflussen (Hoff *et al.* 2012). Coghe *et al.* (2004b) untersuchten den Einfluss unterschiedlicher dunkler

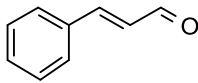
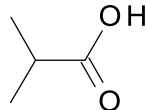
Malzsorten auf den Geschmack von Bierwürze. Im Verkostungspanel wurde deutlich, dass je dunkler die verkostete Bierwürze war, umso mehr bittere und verbrannte Aromen wurden intensiver wahrgenommen. Zusätzlich verringerte sich die Intensität der süßen und rauchigen Aromaeindrücke. Die Verkostung von unterschiedlichen Würzen, die eine identische Farbe aufwiesen, zeigte, dass nicht nur die Menge der eingesetzten Spezialmalze und die Malzfarbe Einfluss auf das Aroma haben, sondern auch der Ursprung des verwendeten Malzes (Coghe *et al.* 2004b).

De Schutter *et al.* (2008b) zeigten, dass die Bildung von Streckeraldehyden in ungehopfter Bierwürze linear zur Kochzeit verlief. Die Herabsetzung des pH-Wertes von 5 auf 4 führte bei fast allen flüchtigen Komponenten zu einem Anstieg der Konzentration. Die Konzentration von Furfural stieg zwischen pH 5 und pH 4 um 137%. Die Anfangsphase der Maillardreaktion wird durch höhere pH-Werte gefördert. Verbindungen wie Hexanal, Pentanal, (*E*)-2-Nonenal,  $\beta$ -Damascenon, 4-Cyclopenten-1,3-dion und  $\gamma$ -Nonalacton wiesen die höchsten Gehalte bei den niedrigsten pH-Werten auf (De Schutter *et al.* 2008b). Der Gehalt an  $\beta$ -Damascenon stieg mit sinkendem pH-Wert (unter 4,2) an. Die Autoren gehen von einer säurekatalysierten Freisetzung aus glykosylierten Vorstufen aus (Gijs *et al.* 2002).

### **3.3.3 Fermentation von ungehopfter Bierwürze durch *I. benzoinum***

Die Fermentation von ungehopfter Bierwürze durch *I. benzoinum* führte zu einem intensiv grünen Geschmackseindruck des Getränks. Im Zuge der olfaktometrischen Untersuchung des aus der Kultivierung von *I. benzoinum* mit Bierwürze gewonnenen Aromaextraktes wurden 30 aromaaktive Verbindungen wahrgenommen. Durch den Vergleich der gaschromatographischen und massenspektrometrischen Daten mit authentischen Standards und Literaturwerten wurden 13 Aromastoffe identifiziert. Die Mehrheit der aromaaktiven Substanzen wurde sowohl in der Bierwürze als auch in dem korrespondierenden Substratblindwert nach 7 h nachgewiesen. Zimtaldehyd und Isobuttersäure entstanden im Zuge der Fermentation (Tabelle 3.5).

Tabelle 3.5: Durch die Fermentation von ungehopfter Bierwürze durch *I. benzoinum* gebildete Aromastoffe (7 h) mit den Geruchseindrücken und den Strukturformeln

Substanz	Geruchseindruck	Strukturformel
Zimtaldehyd	fruchtig, frisch	
Isobuttersäure	muffig	

Zimtaldehyd mit seinem typischen Geruchseindruck (Zimt, Rosenapfel) wurde bereits durch die Biokonversion von Rizinusöl durch den Basidiomyceten *Polyporus* sp. in Gehalten von bis zu 5 mg L<sup>-1</sup> nachgewiesen (Guedes *et al.* 2004; Tiefel und Berger 1993). Krings *et al.* (1996) zeigten, dass *I. benzoinum* nach 8 Tagen 0,2 mg L<sup>-1</sup> Zimtaldehyd aus der Vorstufe L-Phenylalanin bildete. Hierbei stellte Zimtaldehyd das Zwischenprodukt der Reduktion des PAL Reaktionsproduktes Zimtsäure zu 3-Phenylpropanol über Zimtaldehyd und Zimtalkohol dar. Die weiteren Metabolite dieser Reaktion wurden auf Grund der kurzen Fermentationszeit von nur 7 h nicht detektiert. Analoge Ergebnisse zeigten Lomascolo *et al.* (2001). Hierbei wurde L-Phenylalanin durch *Trametes suaveolens* hauptsächlich zu 3-Phenylpropanol über die bereits erwähnten Metabolite abgebaut.

Isobuttersäure wurde in der vorliegenden Arbeit mit einem muffigen Geruch wahrgenommen. In der Literatur wird eine große Vielfalt unterschiedlicher olfaktorischer Beschreibungen wie Käse, phenolisch, fettig und süß verwendet (Giri *et al.* 2010; Culleré *et al.* 2004; Ferreira *et al.* 2001; Zimmermann und Schieberle 2000; Rychlik *et al.* 1998). Als ein charakteristischer Aromastoff des frischen Fruchtkörpers des gemeinen Schwefelporlings (*Polyporus sulfureus*) oder im englischen Sprachgebrauch auch als „chicken of the woods“ bezeichnet, wurde Isobuttersäure identifiziert (British Mycological Society 2012; Wu *et al.* 2005b). Auch in den Fruchtkörpern des Eichen-Leberreischlings *Fistulina hepatica* mit seinem sauren und gerbstoffartigen Geschmack, wurde Isobuttersäure als flüchtige Komponente identifiziert (Wu *et al.* 2005a). Typischerweise wird Isobuttersäure bei fermentativen Prozessen der Lebensmittelproduktion gebildet. Hierbei entsteht sie aus dem Abbau von verzweigtkettigen Aminosäuren wie Valin, Isoleucin und Leucin z. B. durch *Streptococcus diacetylactis*, *Lactobacillus* No. 138 und *Staphylococcus xylosus* (Beck *et al.* 2002; Nakae und Elliott 1965).

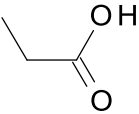
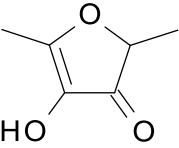
Der stark grüne Geruchseindruck der Fermentation deckte sich nicht mit dem olfaktometrisch bestimmten Geruch der Biotransformationsprodukten. Weiter könnten durch die geringe Fermentationszeit von nur 7 h aromaaktive Verbindungen nur in sehr

geringen Mengen in der Kultivierung vorkommen, so dass eine Detektion nicht möglich war. (Z)-3-Hexenal, (E)-2-Hexenal, Hexenal und ihre korrespondierenden Alkohole rufen grüne Geruchseindrücke hervor, die auch als „grüne organoleptische Sensationen“ bezeichnet werden. In der Natur entstehen diese höheren aliphatischen Aldehyde, wie C8- und C9-Verbindungen, aus der Hydroperoxidation und Spaltung von Linolsäure und Linolensäure durch sequenzielle Aktivität der Lipoxygenase und Hydroperoxidlyase. Die korrespondierenden Alkohole entstehen durch die Aktivität von Alkoholdehydrogenasen (Schrader 2007).

### 3.3.4 Fermentation von ungehopfter Bierwürze durch *T. chioneus*

Die Kultivierung von *T. chioneus* mit ungehopfter Bierwürze führte zu einem Getränk mit einem stark blumigen, süßen, fruchtigen und an Honig erinnernden Geschmack. Im Aromaextrakt der Fermentation von ungehopfter Bierwürze durch den Weißfäulepilz *T. chioneus* wurden mittels GC/O 28 geruchsaktive Komponenten nachgewiesen und 15 Aromastoffe identifiziert. Im Zuge der Fermentation wurden im Vergleich zum korrespondierenden Substratblindwert (17 h) fünf Aromastoffe gebildet (Tabelle 3.6.). Die Aromastoffe Benzaldehyd, Propionsäure, Isobuttersäure, Phenyllessigsäuremethylester und Furaneol prägten das Aroma dieses neuen Getränks.

Tabelle 3.6: Durch die Fermentation von ungehopfter Bierwürze durch *T. chioneus* gebildeten Aromastoffe (17 h) mit den Geruchseindrücken und den Strukturformeln

Substanz	Geruchseindruck	Strukturformel
Benzaldehyd	süßlich	Tabelle 3.3
Propionsäure	blumig, süßlich	
Isobuttersäure	süßlich	Tabelle 3.5
Phenyllessigsäuremethylester	blumig, Honig	Tabelle 3.1
Furaneol	süßlich, Gebackenes, Kuchen	

Benzaldehyd ist eine typische flüchtige Komponente zahlreicher Basidiomyceten (Fraatz und Zorn 2010). Benzaldehyd zeichnete sich durch seinen charakteristischen Geruch nach verbranntem Zucker und Mandeln aus (Valim *et al.* 2003) und wurde in der vorliegenden Untersuchung als süßlich wahrgenommen. *B. adusta* bildet Benzaldehyd aus L-Phenylalanin. L-Phenylalanin wird zuerst mittels PAL zu Zimtsäure abgebaut und dann in die phenolischen Säuren Phenylbrenztraubensäure, Phenylelessigsäure, Mandelsäure und  $\alpha$ -keto-Phenylelessigsäure konvertiert. In einem weiteren Schritt kommt es zur Transformation zu Benzaldehyd, Benzylalkohol und Benzoesäure (Lapadatescu *et al.* 1997). *Trametes suaveolens*, *Polyporus tuberaster* K2606 und *Pycnoporus cinnabarinus* waren ebenfalls in der Lage L-Phenylalanin zu Benzaldehyd zu transformieren (Kawabe und Morita 1994; Lomascolo *et al.* 1999; Lomascolo *et al.* 2001).

Propionsäure mit ihrem stechend, sauren, an Käse, Butter, Himbeere, Erdbeere und Cognac erinnernden Geruchseindruck (Schrader *et al.* 2004) wurde in der vorliegenden Arbeit als blumig und süßlich wahrgenommen. Typischerweise wird diese Säure mikrobiell z. B. durch *Propionibacterium acidipropionici* und *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* aus Glycerol, Lactose oder Glucose gebildet (Goswami und Srivastava 2000; Himmi *et al.* 2000; Jin und Yang 1998). Die Oxidation von Propan-1-ol, welches in der verwendeten Bierwürze vorkommt, durch *Gluconobacter oxydans*, ist ebenfalls möglich (Švitel und Šturdík 1995). Auch in dieser Fermentation wurde analog zur Kultivierung von *I. benzoinum* mit ungehopfter Bierwürze Isobuttersäure nachgewiesen. *S. cerevisiae* verwendete Valin als Vorstufe für die Produktion von Isobutanol und Isobuttersäure, gleichzeitig beeinflusste Valin indirekt die Produktion von Propanol und Propionsäure (Lilly *et al.* 2006).

Das mittels Fermentation durch *T. chioneus* gewonnene neuartige Getränk wies einen stark blumigen, honigartigen Geschmack auf. Der Aromastoff Phenylelessigsäuremethylester, der im Zuge der Kultivierung gebildet wurde, besitzt einen an Honig erinnernden Geruch (Steinhaus und Schieberle 2000). In Submerskulturen von *Nigroporus durus*, *Polyporus tumulosus* und *Sarcodontia setosa* wurden Gehalte an Phenylelessigsäuremethylester von bis zu  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  nachgewiesen (Abraham und Berger 1994). In den Flüssigkulturen von *Lenzites frabea*, *Polyporus betulinus*, *Polyporus frondosus*, *Poria subacida* und *Poria subvermispora* wurden ebenfalls geringe Gehalte von bis zu  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  nachgewiesen (Gallois *et al.* 1990). Auch in den Fruchtkörpern von *Gloeophyllum odoratum*, welche einen anis- und fenchelartigen Geruch aufweisen, war Phenylelessigsäuremethylester nachweisbar (Rösecke und König 2000). Diese Ergebnisse wurden von Kahlos *et al.* (1994) bei Plattenkultivierung bestätigt.



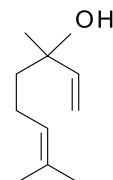
Ester sind in Früchten weit verbreitet und besonders Ester mit einem geringen Molekulargewicht beeinflussen charakteristisch fruchtige Noten von zahlreichen Lebensmitteln, z. B. fermentierten Getränken (Schrader 2007). Hanssen und Abraham (1987) ersetzten einen Teil der Stickstoffquelle durch 0,15% L-Phenylalanin bei der Submerskultivierung von *Gloeophyllum odoratum* und in diesem modifiziertem Medium kam es zur Bildung von Phenylelessigsäuremethylester. Die Vorstufe von Phenylelessigsäuremethylester war demnach L-Phenylalanin.

Als weiterer Aromastoff wurde 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanon (Furaneol) gebildet. Furaneol vermittelt einen stark süßlichen Geruchseindruck. Culleré *et al.* (2004) beschrieben den Geruch von Furaneol als an Zuckerwatte erinnernd. Furaneol gehört zu der Gruppe der Furanone und wird im Zuge der Maillard-Reaktion in Bierwürze, aber verstärkt durch den Hefemetabolismus bei der Bierproduktion gebildet (Hayashida und Slaughter 1997; Mackie und Slaughter 2002). Sowohl in der mikrobiellen als auch in der hitzeinduzierten Bildung stellt Fructose-1,6-biphosphat die Vorstufe dar (Hauck *et al.* 2003; Schieberle 1992). Hauck *et al.* (2003) zeigten die Bildung von Furaneol aus D-Fructose-1,6-biphosphat durch die Hefe *Zygosaccharomyces rouxii*. Die Hefe *Pichia capsulata* produzierte nach vier Kulturtagen in einem Caseinpeptonmedium mit L-(+)-Rhamnose bis zu 2 mg L<sup>-1</sup> Furaneol. Die Maillardintermediate, welche durch den Sterilisierungsprozess gebildet wurden, wurden durch *P. capsulata* zu Furaneol transformiert (Roscher *et al.* 1997). Auch das Altern von Bier führt zu einer Zunahme an Furaneol (Bravo *et al.* 2008).

### 3.3.5 Fermentation von ungehopfter Bierwürze durch *W. cocos*

Die Fermentation von ungehopfter Bierwürze durch *W. cocos* führte zu einem blumigen, herben, nach Zitrone, Honig und Tee schmeckenden Getränk. Mittels GC/O wurden in dem Aromaextrakt der Fermentation von ungehopfter Bierwürze durch *W. cocos* 27 Geruchseindrücke wahrgenommen. Eine Substanzzuordnung war bei 16 geruchsaktiven Komponenten möglich. Im Zuge der Fermentation wurden fünf Aromastoffe (Linalool, Isobuttersäure, Benzylalkohol, Furaneol und Phenylelessigsäure, Tabelle 3.7) neu gebildet.

Tabelle 3.7: Durch die Fermentation von ungehopfter Bierwürze durch *W. cocos* gebildete Aromastoffe (25 h) mit den Geruchseindrücken und den Strukturformeln

Substanz	Geruchseindruck	Strukturformel
Linalool	blumig	
Isobuttersäure	süßlich, blumig, frisch	Tabelle 3.5
Benzylalkohol	holzig, süßlich, würzig	Tabelle 3.3
Furaneol	süßlich, Zuckerwatte	Tabelle 3.6
Phenylelessigsäure	fruchtig, süßlich	Tabelle 3.1

Terpene sind als Aromastoff in zahlreichen Basidiomyceten zu finden (Fraatz und Zorn 2010). Linalool mit seinem charakteristischen fruchtigen, grünen und süßen Geruchseindruck wurde in Fruchtkörpern von *Clitocybe odora*, *Fistulina hepatica*, *Lepista nuda*, *Mycena rose*, *Tricholoma sulfureum*, *Hydnum repandum*, *Lactarius salmonicolor*, *Gomphidius glutinosus*, *Agrocybe aegerita*, *Boletus erythropus* und *Clitocybe nebularis* identifiziert (Breheret *et al.* 1997; Choi 2003; Rapior *et al.* 2002; Wu *et al.* 2005a). In den Fruchtkörpern von *Tricholoma matsutake* wurde eine Zunahme des Linaloolgehaltes im Zuge des Reifungsprozesses festgestellt. Mittels HS-SPME-GC/MS wurde Linalool in einer Emerskultur von *Antrodia camphorata* nachgewiesen. Die zahlreichen Terpene und Terpenalkohole beeinflussten den kräuterigen, frischen Eindruck dieses Basidiomyceten (Xia *et al.* 2011). Auch das neuartige Getränk, welches durch die Fermentation durch *W. cocos* gewonnen wurde, wies einen frischen, teeartigen Geschmack auf. *W. cocos* ist dafür bekannt, das flüchtige 3,7-Dimethylocta-1,6-dien-3-ol zu bilden (Krings *et al.* 1995). Die Hefen *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* und *Torulaspora delbrueckii* transformierten Geraniol zu Linalool. Hierbei kam es zu einer Isomerisierung von Geraniol zu Nerol und von Nerol zu Linalool (King und Dickinson 2000). *S. cerevisiae* ist aber auch in der Lage, Linalool *de novo* über den 3-Methylcrotonoyl-CoA-Carboxylase (MCC)-Biosyntheseweg aus der Aminosäure Leucin zu bilden (Carrau *et al.* 2005).

Im Zuge der Fermentation wurde Benzylalkohol, welches als holzig, süßlich und würzig wahrgenommen wurde, identifiziert. In der Literatur wird dieser Aromastoff als blumig und an Trockenfrüchte erinnernd beschrieben (Fang und Qian 2005). Benzylalkohol wurde bereits in den Basidiomyceten *Agaricus bisporus*, *Pleurotus florida*, *Agaricus campestris*, *Boletus edulis*, *Cantharellus cibarius*, *Lepiota proeera*, *Clitocybe maxima*, *Pleurotus ferulae* und *Pleurotus ostreatus* identifiziert (Buchbauer *et al.* 1993; Tsai *et al.*

2009). *B. adusta*, *I. benzoinum* und *Dichomitus squalens* bildeten Benzylalkohol, wenn sie in einem mit L-Phenylalanin supplementierten Medium kultiviert wurden (Lapadatescu *et al.* 1997).

Furaneol wurde, analog zur Fermentation von Bierwürze durch *T. chioneus*, in der Kultivierung von *W. cocos* mit ungehopfter Bierwürze als ein aromaaktives Fermentationsprodukt identifiziert. Diese Verbindung ist auch eine Aromakomponente in zahlreichen Obstarten. Furaneol kommt als wichtiger Aromastoff in Erdbeeren und Ananas vor (Du *et al.* 2011; Schulbach *et al.* 2004; Tokitomo *et al.* 2005; Ubeda *et al.* 2012). In der gelben Passionsfrucht sowie in brasilianischem Cabernet Sauvignon Wein wurde Furaneol als Aromastoff identifiziert (Falcão *et al.* 2008; Jordán *et al.* 2002a). Furaneol, mit seinem süßlichen Geruch nach Karamell und Süßigkeiten (Du *et al.* 2011), findet sich in dem fruchtigen Geschmack dieses durch die Fermentation von Bierwürze durch *W. cocos* gewonnen Getränkes wieder.

Phenylelessigsäure war eine flüchtige Komponente der frischen, unbehandelten Bierwürze. In den analog zu den Fermentationen durchgeführten Substratblindwerten wurde keine Phenylelessigsäure identifiziert. Dieser Aromastoff wurde in der Literatur als süßlich und honigartig beschrieben (Escudero *et al.* 2007) und als fruchtig und süßlich olfaktometrisch bestimmt. Bei Phenylelessigsäure handelt es sich wahrscheinlich, um ein Zwischenprodukt der Benzylalkoholproduktion aus L-Phenylalanin (Lapadatescu *et al.* 2000). Bei der Biokonversion von L-Phenylalanin durch *B. adusta* ist Phenylelessigsäure ein Intermediärmetabolit zu Benzaldehyd und dem in der hier untersuchten Fermentation gebildeten Aromastoff Benzylalkohol (Lapadatescu *et al.* 2000). Auch zwei unterschiedliche Stämme von *B. adusta* produzierten Phenylelessigsäure (Silk *et al.* 2001). Bei der Biotransformation von L-Phenylalanin durch *I. benzoinum* zu Benzaldehyd und 3-Phenylpropanol entstand ebenfalls der Metabolit Phenylelessigsäure (Krings *et al.* 1996).

## 4 Ausblick

Die Biotransformation von Reststoffen der Lebensmittelindustrie zu komplexen Aromastoffgemischen wurde erfolgreich durchgeführt. Besonders Reststoffe aus der obstverarbeitenden Lebensmittelproduktion führten zu zahlreichen interessanten Kulturen. Bisher wurden nur wenige potenzielle Reststoffe untersucht. Die Verwertung von weiteren Obstresten könnte zu neuen Aromastoffgemischen führen. Besonders bei der Verarbeitung von Obstarten aus tropischen Klimabereichen, z. B. Mango, fallen große Mengen an Reststoffen an, die durch eine Umsetzung mit Basidiomyceten zu hochwertigen Produkten weiterverarbeitet werden könnten.

Die Biotransformationen von Weintresterpresskuchen durch *W. cocos* sowie von Apfeltrester und Weintresterpresskuchen durch *T. chioneus* führten zur Bildung zahlreicher Aromastoffe. Die Kulturbedingungen sowohl in der Hauptkultur als auch in der Vorkultur bieten noch Optimierungspotenzial. So können die Medien vereinfacht und auf die spezifischen Nährstoffbedürfnisse von *W. cocos* und *T. chioneus* hin optimiert werden. Eine Ausbeutesteigerung der gebildeten Aromastoffe kann z. B. durch eine Veränderung der Kultivierungsbedingungen erzielt werden. Hierbei stellt die *Fed-Batch*-Fermentation eine mögliche Technik dar. Zusätzlich kann die Ausbeute an Aromastoffen durch *in situ*-Produktentnahme, z. B. durch einen Bioreaktor, der an eine Pervaporationsanlage gekoppelt wird, gesteigert werden, da die gebildeten Metaboliten häufig ab einer bestimmten Konzentration negative Effekte auf das Wachstum der Basidiomyceten haben.

Die Aromastoffe 3-Phenylpropanal und 3-Phenylpropanol entstanden durch reduktive Aktivitäten des Basidiomyceten *T. chioneus* aus der Vorstufe Zimtsäure. Der Einsatz dieses Basidiomyceten zur Reduktion anderer Verbindungen erscheint möglich. Die Bildung von natürlichen, aromaaktiven Aldehyden, aus der korrespondierenden Säure (z. B. Fettsäuren) wäre eine mögliche Anwendung. In weiterführenden Schritten kann die Identifizierung, die heterologe Expression in einem geeigneten Wirtssystem (z. B. *E. coli*), die Reinigung und proteinbiochemische Charakterisierung des Enzyms mit seiner reduktiven Aktivität erfolgen.

Bereits das Screening von fünf Substraten mit sieben verschiedenen essbaren Basidiomyceten führte zu zahlreichen ansprechenden Getränken. Eine Weiterführung des Screenings mit weiteren Basidiomyceten und Substraten (z. B. Milch) kann zu einer noch größeren Vielfalt an fermentativ aromatisierten Getränken führen. Die Rezeptur für die

Getränkeherstellung durch die Fermentation von ungehopfter Bierwürze durch *T. chioneus*, *W. cocos* und *I. benzoinum* kann durch Optimierung der Fermentationsbedingungen (Vorkulturmedium, pH, Inokulummenge, Rührkesselreaktor oder Festbettreaktor), Ansäuerung, Carbonisierung sowie Farbgebung weiter modifiziert und durch sensorische Panels bestätigt werden. Das entwickelte Getränk muss dann durch ein geeignetes Verfahren haltbar gemacht werden (z. B. Kurzzeiterhitzung) und die Lagerstabilität anschließend evaluiert werden. Weitergehend sollte das fertige Getränk noch toxikologisch (z. B. Genotoxizität und Cytotoxizität) untersucht und bezüglich der Einstufung gemäß Novel Food-Verordnung rechtlich beurteilt werden.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Chemikalien und Geräte

Tabelle 5.1: Verwendete Geräte und Hilfsmittel

Gerät	Modell	Firma
Autoklav	Laboklav 25	SHP Steriltechnik, Detzel Schloss/Satuelle
Bördelkappen	Aluminium Bördelkappen mit Silikon/PTFE, N20 TS/oA	Omnilab, Bremen
Bunsenbrenner	1160 DE	Juchheim Laborgeräte, Bernkastel Kues
Destillationsapparatur	behr S3	Behr Labor Technik, Düsseldorf
Dewargefäß		KGW Isotherm, Karlsruhe
Dispergiergerät	T25 digital Ultra Turrax	IKA®, Staufen
Elektronischer Feuchtebestimmer	Sartorius Moisture Analyser MA 35	Sartorius mechatronics, Göttingen
Filterpapier	MN 615 ¼ ø = 185 mm REF 531018	Macherey-Nagel GmbH + Co.KG, Düren
Gasbrenner	gasprofi 1 SCS micro	WLD TEC, Göttingen
Gaschromatograph mit Flammenionisations- detektor und Olfaktometrieport	Agilent 7890A	Agilent Technologies, Santa Cruz US
Gaschromatograph mit massenselektivem Detektor Geldokumentation	Agilent 7890A  DeVisionG	Agilent Technologies  Decon DC Science Tec, Hohengandern
Gelkammer	PerfectBlue TM	PeqLab, Erlangen
Handstepper	Handy Step®	Brand, Wertheim
Headspacevial	10 mL Headspaceflasche, 46x22,5 mm, Klarglas; HS 200095;	Achroma Olivier Hoffrath GmbH, Mühlheim
Heizrührer	IKA® RH basic 2	IKA®
Injektionsspitze, on-column	Agilent Gold Standard Spritze 5 µL	Agilent Technologie
Injektionsspritze	Gastight® # 1701 10 µL	Hamilton, USA
Inkubationsschüttler	Multitron AJ 118	Infors, Einsbach
Inkubationsschüttler	Minitron	Infors
Inkubator	INE 500	Memmert, Schwabach
Kjeldahltherm- Aufschlussapparatur	behrotest® KJ 10	Behr Labor Technik
Kühlschrank	KUW 1740x	Liebherr, Ochsenhausen

<b>Gerät</b>	<b>Modell</b>	<b>Firma</b>
Kühlschrank	MEDline	Liebherr
Mikrowelle	MWG 1227 CB	Bomann, Kempen
Muffelofen	L9/11/B180	Nabertherm, Lilienthal
NanoDrop	ND 1000 Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
PCR-Werkbank	UV Sterilizing PCR Workstation	PeqLab
PDMS-Membran	PervapTM 4060, Durchmesser 130 mm	Sulzer ChemTech, Winterthur, Schweiz
pH-Meter	SevenEasy	Mettler Toledo, Gießen
Pipette 100-1000 µL	peqPETTE	Peqlab
Pipette 500-5000 µL	Research®	Eppendorf, Hamburg
Power Supply	EV200 Peqlab Power Supply	Peqlab
Pumpe (Rotationsverdampfer)	VP 2 autovac/ Pump MD 10 VARIO	VWR, Darmstadt
Reinstwassersystem	arium 611 VF	Sartorius, Göttingen
Rotationsverdampfer	RV 10 digital	VWR
SPME-Faser	DVB/CAR/PDMS-Faser	Supelco Park, Bellefonte, USA
SPME-Halter	Bulletin 929	Supelco Park
Sterile Werkbank	HERAsafe KS	Thermo Fisher Scientific
Strohmühle	Polymix PX-MFC 90 D	Kinematica, Littau-Luzern
Thermoblock	MKR 13	HLC BioTech, Bovenden
Thermocycler	Alpha SC	Analytik Jena, Jena
Tischzentrifuge	Microfuge® 22R Centrifuge	Beckman Coulter TM, Krefeld
Trockenschrank	Dry-Line 115	VWR
Ultraturrax	T25 digital UltraTurrax	IKA®
Umwälzkühler	Minichiller-NR	Huber, Offenburg
Waage (fein)	BP 211 P	Sartorius
Waage (grob)	Acculab ATL-6202-I	Sartorius
Wasserbad	ED	Julabo, Seelbach
Zentrifuge	Allegra X-15R	Beckman Coulter

Tabelle 5.2: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Qualität	Hersteller
Agar-Agar, Kobe I	reinst	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose LE		Biozym, Hessisch Oldendorf
Alkan-Standard-Lösung C8-C20	Standard für GC	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Benzaldehyd	zur Synthese	AppliChem, Darmstadt
Benzylalkohol	reinst Ph. Eur.	AppliChem
Borsäure	≥ 99,5% p. a.	Carl Roth
Bromphenolblau, Natriumsalz	f. d. Elektrophorese	Carl Roth
Butan-1-ol	p. a.	AppliChem
Butan-2,3-diol	zur Synthese	Carl Roth
Buttersäure	≥ 99%, zur Synthese	Carl Roth
Capronsäure	98%	Alfa Aesar, Karlsruhe
Casein-Hydrolysat	für die Molekularbiologie	Carl Roth
Citral	95%	Alfa Aesar
Chlorogensäure	99%	Acros Organics, Geel BE
Citronensäure-Monohydrat	≥ 99%, p. a.	Carl Roth
<i>p</i> -Cumarsäure	≥ 98%	Sigma-Aldrich
$\beta$ -Damascon	≥ 90%	Sigma-Aldrich
Diethylether	99,5%, p. a.	Carl Roth
2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)- furanon	≥ 99%	Sigma-Aldrich
Docosan	≥ 99,5%	Sigma-Aldrich
EDTA	99%, p. a.	AppliChem
Eisenchlorid-Hexahydrat	p. a.	AppliChem
Essigsäure	96%, p. a.	Merck
Ethanol	99,5%, p. a.	Carl Roth
2-Furanmethanol	99%	Sigma-Aldrich
Farnesen	koscher	Sigma-Aldrich
Furfural	99%	Sigma-Aldrich
Furfurylalkohol	99%	Sigma-Aldrich



<b>Chemikalie</b>	<b>Qualität</b>	<b>Hersteller</b>
Geraniol	97%	Alfa Aesar
Geranylaceton	>96.0%	TCI, Portland, USA
Hefeextrakt	reinst	Fisher Scientific, Schwerte
Helium	5.0	Air Liquide, Düsseldorf
Heneicosan	≥ 99,5%	Sigma-Aldrich
Heptacosan	≥ 99,5%	Sigma-Aldrich
1H-Pyrrol-2-carboxaldehyd	98%	Acros Organics
( <i>trans</i> )-2-Hexensäure	99%	Sigma-Aldrich
Hexacosan	≥ 99,5%	Sigma-Aldrich
3-Hydroxybutan-2-on	92%	Sigma-Aldrich
4-Hydroxy-4-methylpentan-2-on	≥ 99%	Acros Organics
Hydrozimsäuremethylester	≥ 98%	TCI
Iod	reinst	AppliChem
Isobuttersäure	≥ 99,5 %	Sigma-Aldrich
Isovaleriansäure	99+%	Sigma-Aldrich
Kaffeesäure	≥ 95%	Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	≥ 99%, p. a.	Carl Roth
Kaliumhexacyanoferrat(II)	≥ 99%	Carl Roth
Kaliumiodid	p. a.	Merck
Katalysatortabletten	Quecksilber- und Selenfrei	Carl Roth
Kupfersulfat-Pentahydrat	≥ 99%, p. a.	Acros Organics
L-Asparagin-Monohydrat	≥ 99%, p. a.	Carl Roth
Linalool	97%	Acros Organics
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	≥ 99%, p. a.	Carl Roth
Magnesiumsulfat-Hydrat	≥ 99%, p. a.	Carl Roth
Maltol	≥ 98,5	Sigma-Aldrich
Mangansulfat-Monohydrat	reinst	Carl Roth
3-Methylbutan-1-ol	98%	Sigma-Aldrich

<b>Chemikalie</b>	<b>Qualität</b>	<b>Hersteller</b>
2-Methylbuttersäure	98%	Alfa Aesar
Methyl-2-furoat	98%	Acros Organics
5-Methylheptan-3-on	zur Synthese	Merck
2-Methylpropan-1-ol	≥ 99%, zur Synthese	Carl Roth
4-Methylpyrimidin	≥ 96%	TCI
2-Methoxy-4-vinylphenol	≥ 98%	Sigma-Aldrich
Natriumcarbonat-Decahydrat	≥ 99%, p. a.	Carl Roth
Natriumchlorid	reinst	AppliChem
Natriumhydroxid	99%, p. a.	AppliChem
Natriumsulfat, wasserfrei	≥ 99%, p. a.	Carl Roth
Natriumthiosulfat-Maßlösung	≥ 99%, p. a.	Carl Roth
Natronlauge	32%, p. a.	Carl Roth
<i>n</i> -Octadecan	99%	Acros Organics
Oct-1-en-3-ol	98%	Acros Organics
Nonan-2-ol	99%	Sigma-Aldrich
Nonan-2-on	≥ 99%	Acros Organics
Pepton aus Soja	für die Mikrobiologie	Carl Roth
<i>n</i> -Pentan	≥ 99%, p. a.	Fisher Scientific
Pentacosan	≥ 99,5%	Fluka Analytical, Sigma-Aldrich
Petrolether	tiefsiedend (40-60 °C)	Sigma-Aldrich
L-Phenylalanin	Zellkulturqualität	Carl Roth
Phenolphthalein-Lösung	1%ig in Ethanol	Merck
Phenylelessigsäure	99%	Sigma-Aldrich
Phenylelessigsäuremethylester	99%	Sigma-Aldrich
2-Phenylethanol	99%	Acros Organics
3-Phenylpropanal	≥ 90%	Sigma-Aldrich
3-Phenylpropanol	98%	Sigma-Aldrich
Propan-1-ol	99,5%	Carl Roth
Salzsäure	25%, p. a.	Carl Roth
Salzsäure, rauchend	37%, p. a.	Merck
Schwefelsäure	98%, p. a.	Carl Roth
Sher-Indikator	Mischindikator	BÜCHI Labortechnik, Essen
Stärke	löslich	Carl Roth
Stickstoff	5.0	Air Liquide
Tetracosan	≥ 99,5%	Fluka Analytical, Sigma-Aldrich
Thymol	96%	Carl Roth
Traubenzucker/ Dextrose		Frießinger Mühle, Bad Wimpfen
Tricosan	≥ 99,5%	Fluka Analytical, Sigma-Aldrich
L-Tyrosin	99,5%	Calbiochem, San Diego

<b>Chemikalie</b>	<b>Qualität</b>	<b>Hersteller</b>
Undecan-2-on	≥ 97%	Sigma-Aldrich
Wasserstoff	5.0	Air Liquide
Xylencyanol	für die Elektrophorese	Merck
Zimtaldehyd	≥ 99%	Carl Roth
Zimtsäure	98%	Acros Organics
( <i>E</i> )-Zimtsäure d7	98%	Sigma Aldrich
Zimtsäuremethylester	99%	Alfa Aesar
Zinkacetat-Dihydrat	≥ 99,5%, p. a.	Carl Roth
Zinksulfat-Heptahydrat	p. a.	AppliChem

Die verwendeten Lösungen und deren Reagenzien sowie Kits sind in Tabelle 5.3 und Tabelle 5.4 aufgelistet.

*Tabelle 5.3: Verwendete Lösungen*

<b>Lösung</b>	<b>Reagenzien*</b>
Carrez-Lösung I	Kaliumhexacyanoferrat(II) 150 g L <sup>-1</sup>
Carrez-Lösung II	Kupfersulfat-Pentahydrat 230 g L <sup>-1</sup>
Lösung nach Luff	Citronensäure-Monohydrat 50 g (50 mL) <sup>-1</sup> Natriumcarbonat-Decahydrat 389 g (350 mL) <sup>-1</sup> Kupfersulfat-Pentahydrat 25 g (100 mL) <sup>-1</sup>

\*: in dest. Wasser gelöst

*Tabelle 5.4: Verwendete Kits*

<b>Kit</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Hersteller</b>
Nucleo Spin <sup>®</sup> Plant II	Isolierung genomischer DNA	Macherey-Nagel, Düren
Nucleo Spin <sup>®</sup> Extract II	Reinigung von PCR-Produkten	Macherey-Nagel

## 5.2 Biotransformation von Nebenströmen der Lebensmittelindustrie zu hochwertigen Aromastoffgemischen

### 5.2.1 Substrate und Mikroorganismen

#### 5.2.1.1 Substrate

Kakaopulver (KP) wurde unbehandelt eingesetzt. Kakaoschalen (KK) wurden mit einer Strohühle (Polymix PX-MFC 90 D, Kinematica, Littau-Luzern) homogenisiert (Siebgröße 2,0 mm). Waffelbruch (WB) wurde mit einer Küchenmaschine zerkleinert und mit Hilfe eines Siebs (Prüfsieb DIN 4188) auf eine Korngröße von  $\leq 1$  mm vereinheitlicht. Apfeltrester (AT), Kaffeegrund (KG), Teigbruch (TB), Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer, Neustadt/Weinstraße, WT) und Weintrester (Gewürztraminer, Gengenbach, WT<sub>g</sub>) wurden bei -20°C eingefroren und mit Hilfe einer Gefriertrocknungsanlage (Alpha 1-2 LD plus, Christ, Osterode am Harz) getrocknet (Restfeuchte max. 8%, i.d.R. < 6%). Apfeltrester (AT) und Weintrester (WT<sub>g</sub>) wurden nach dem Gefriertrocknen mit Hilfe einer Küchenmaschine homogenisiert. Mit Ausnahme des Kaffeegrundes (KG) wurden die übrigen Substrate gemörst und mit Hilfe eines Prüfsiebes auf eine definierte Korngröße vereinheitlicht. Apfeltrester (AT<sub>u</sub>) und Weintrester (WT<sub>u</sub>, WT<sub>gu</sub>) wurden zusätzlich unbehandelt als Substrate eingesetzt (Tabelle 5.5) Die Reststoffströme wurden so verwendet, dass ein Gesamtkohlenhydratgehalt von ca. 15 g L<sup>-1</sup> Medium erhalten wurde. Bei einzelnen Reststoffen wurde eine geringere Einwaage verwendet, um unerwünschte Veränderungen des Mediums, wie zum Beispiel eine zu hohe Viskosität, zu verhindern.

*Tabelle 5.5: Beim Screening verwendete Reststoffe; Abkürzung, Korngröße, Restfeuchte und Einwaage*

#	Substrat	Abk.	Korngröße [mm]	Restfeuchte [g (100 g) <sup>-1</sup> ]	Einwaage [g L <sup>-1</sup> Medium]
1a	Apfeltrester, lyophilisiert	AT	1	4,1	23
1b	Apfeltrester, unbehandelt	AT <sub>u</sub>	n.b.	78,7	112
2	Kaffeegrund, lyophilisiert	KG	1	1,1	35
3	Kakaopulver	KP	<1	8,6	30
4	Kakaoschalen	KK	2	1,9	40
5	Teigbruch, lyophilisiert	TB	1	0,2	25
6	Waffelbruch	WB	1	5,1	17
7a	Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer, Neustadt/Weinstraße), lyophilisiert	WT	1	8,3	40

#	Substrat	Abk.	Korngröße [mm]	Restfeuchte [g (100 g) <sup>-1</sup> ]	Einwaage [g L <sup>-1</sup> Medium]
7b	Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer, Neustadt/Weinstraße), unbehandelt	WT <sub>u</sub>	n.b.	58,5	60
7c	Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer, Neustadt/Weinstraße), unbehandelt (erhöhte Substratgabe)	WT <sub>+</sub>	n.b.	58,5	105
7a	Weintrester (Gewürztraminer, Gengenbach), lyophilisiert	WT <sub>g</sub>	1	4,8	40
7b	Weintrester (Gewürztraminer, Gengenbach), unbehandelt	WT <sub>gu</sub>	n.b.	41,5	60

n.b.: nicht bestimmt

## 5.2.2 Mikroorganismen

Die eingesetzten Mikroorganismen (Tabelle 5.6) wurden über das *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS, Utrecht, Niederlande) und die Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) erworben.

Tabelle 5.6: Im Screening eingesetzte Basidiomyceten mit Herkunft, Stammmnummer und Abkürzung; S = Speisepilz (essbar mit kulinarischem Wert), E = essbar (ungiftig), M = Medizinalpilz

#	Organismus	Trivialname	Herkunft	Stamm- nummer	Abk.	Einteilung
1	<i>Bjerkandera adusta</i>	Angebrannter Rauchporling	DSMZ	4708	BAD	E
2	<i>Clitocybe lignatilis</i>	Holztrichterling	DSMZ	8332	CLI	S
3	<i>Clitopilus passeckerianus</i>	Katzenohrräsling	DSMZ	901	CLP	n.b.
4	<i>Cyathus helenae</i>		CBS	372.80	CHE	n.b.
5	<i>Hypholoma capnoides</i>	Graublättriger Schwefelkopf	DSMZ	3715	HCA	S
6	<i>Ischnoderma benzoinum</i>	Schwarzgebänderter Harzporling	CBS	311.29	IBE	S
7	<i>Kuehneromyces mutabilis</i>	Gemeines Stockschwämmchen	DSMZ	1013	KMU	S

#	Organismus	Trivialname	Herkunft	Stamm- nummer	Abk.	Einteilung
8	<i>Lentinula edodes</i>	Shiitake	CBS	389.89	LED	S
9	<i>Lentinus squarrosulus</i>	Feinsparriger Sägeblättling	DSMZ	9877	LSQU	S
10	<i>Lycoperdon perlatum</i>	Flaschenstäubling	DSMZ	3502	LPE	E
11	<i>Marasmius cohortalis</i>		DSMZ	8257	MCO	S
12	<i>Mycetinis scorodonius</i>	Echter Knoblauch- schwindling	CBS	137.83	MSC	S
13	<i>Nidula niveo- tomentosa</i>	Vogelnestpilz	CBS	380.80	NNI	E
14	<i>Panellus serotinus</i>	Gelbstieliger Muschelseitling	DSMZ	5204	PSER	S
15	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Weißrostpilz	FSU Jena	L 13-2	PCH	n.b.
16	<i>Pleurotus calyptratus</i>	Espen-Seitling	DSMZ	8334	PCAL	E
17	<i>Pleurotus eous</i>	Rosa Austernseitling	DSMZ	5331	PEO	S
28	<i>Pleurotus eryngii</i>	Kräuterseitling	DSMZ	8264	PER	S
19	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Austernseitling	DSMZ	1020	POS	S
20	<i>Pleurotus sapidus</i>		DSMZ	8266	PSA	S
21	<i>Polyporus melanopus</i>	Schwarzfuß- Stielporling	DSMZ	5109	PME	n.b.
22	<i>Polyporus sp.</i> (Eigenisolat)				POL	n.b.
23	<i>Postia caesia</i>	Blauender Saftporling	DSMZ	5124	POCA	S
24	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Blutroter Zinnoberschwamm	DSMZ	3023	PYS	E
25	<i>Stereum sp.</i>	Schichtpilze	DSMZ	8254	SSP	n.b.

#	Organismus	Trivialname	Herkunft	Stamm- nummer	Abk.	Einteilung
26	<i>Trametes suaveolens</i>	Anistramete	DSMZ	5237	TSU	E
27	<i>Trametes versicolor</i> (DSMZ 11269)	Schmetterlings- tramete	DSMZ	11269	TVED	E
28	<i>Trametes versicolor</i> (CBS 480.63)	Schmetterlings- tramete	CBS	480.63	TVEC	E
29	<i>Tyromyces chioneus</i>	Kurzhöhriger Saftporling	DSMZ	5242	TCH	M
30	<i>Wolfiporia cocos</i>	Lu Fing, Indian Bread	CBS	279.55	WCO	E

n.b. = nicht bekannt

### 5.2.3 Kulturmedien

Die einzelnen Komponenten (Tabelle 5.7) wurden in Reinstwasser gelöst und mit NaOH auf pH 6,0 eingestellt. Das verwendete Substrat, die Glucose und die Vitaminlösung wurden getrennt hinzugegeben. Die Reststoffströme wurden so verwendet, dass ein Gesamtkohlenhydratgehalt von ca. 15 g L<sup>-1</sup> Medium erhalten wurde. Bei einzelnen Reststoffen wurde eine geringere Einwaage verwendet, um unerwünschte Veränderungen des Mediums, wie zum Beispiel eine zu hohe Viskosität, zu verhindern. Zur Ermittlung der Vorstufen der Hauptaromakomponenten wurde das Medium mit L-Asparagin, L-Tyrosin, Benzaldehyd,  $\alpha$ -Farnesen, Zimtsäure, Kaffeesäure, *p*-Cumarsäure und Chlorogensäure (M17-25) dotiert. Aufgrund der schlechten Löslichkeit in Wasser wurden zunächst Stocklösungen von  $\alpha$ -Farnesen und Kaffeesäure in Ethanol hergestellt und diese hinzugegeben, sodass die Konzentration von Ethanol im Medium bei 1% lag. Das Medium wurde in Erlenmeyerkolben überführt, bei den Medien 2 - 25 (M2 - M25) das Substrat hinzugesetzt, der pH erneut mit NaOH auf 6,0 eingestellt und die Kolben mit Cellulosestopfen verschlossen. Anschließend wurde die Nährlösung für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Die Glucose für die chemisch definierten Medien M1, M12 und M15 sowie die Vitaminlösung (BME-Lsg.) für die Medien M1 - M3, M6, M8, M13 - M25 wurden separat steril zugesetzt.

*Tabelle 5.7: Zusammensetzung der Nährlösungen; Glc = D-(+)-Glucose-Monohydrat, L-Asn = L-Asparagin-Monohydrat, NaAsp = Natriumaspartat-Monohydrat, MgSO<sub>4</sub> = Magnesiumsulfat-Hydrat, Hefe = Hefeextrakt, SE-Lsg = Spurenelementlösung (Tabelle 5.8), L-Phe = L-Phenylalanin, SP = Sojapepton, CH = Casein-Hydrolysat, L-Tyr = L-Tyrosin, BA = Benzaldehyd, FA = Farnesen, KS = Kaffeesäure, CS = p-Cumarsäure, CHS = Chlorogensäure, ZS = Zimtsäure, D<sub>7</sub>-ZS = (E)-D<sub>7</sub>-Zimtsäure*

	<b>Glc</b> <b>[g L<sup>-1</sup>]</b>	<b>L-Asn</b> <b>[g L<sup>-1</sup>]</b>	<b>NaAsp</b> <b>[g L<sup>-1</sup>]</b>	<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b> <b>[g L<sup>-1</sup>]</b>	<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b> <b>[g L<sup>-1</sup>]</b>	<b>MgSO<sub>4</sub></b> <b>[g L<sup>-1</sup>]</b>	<b>Hefe</b> <b>[g L<sup>-1</sup>]</b>
SNL-H <sup>1</sup>	30,0	4,5			1,5	0,5	3,0
M1	15,0		6,2	2,4	1,5	0,5	
M2			6,2	2,4	1,5	0,5	
M3			6,2	2,4	1,5	0,5	
M4			6,2	2,4	1,5	0,5	
M5					1,5	0,5	
M6				2,4	1,5	0,5	
M7							
M8	15,0				1,5	0,5	
M9			6,2	2,4	1,5	0,5	
M10					0,3	0,3	
M11	1,5		6,2	2,4	1,5	0,5	
M12					1,5	0,5	13,4
M13					1,5	0,5	
M14			6,2	2,4	1,5	0,5	
M15					1,5	0,5	
M16					1,5	0,5	
M17		1,5	6,2	2,4	1,5	0,5	
M18			6,2	2,4	1,5	0,5	
M19			6,2	2,4	1,5	0,5	
	<b>Glc</b> <b>[g L<sup>-1</sup>]</b>	<b>L-Asn</b> <b>[g L<sup>-1</sup>]</b>	<b>NaAsp</b> <b>[g L<sup>-1</sup>]</b>	<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b> <b>[g L<sup>-1</sup>]</b>	<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b> <b>[g L<sup>-1</sup>]</b>	<b>MgSO<sub>4</sub></b> <b>[g L<sup>-1</sup>]</b>	<b>Hefe</b> <b>[g L<sup>-1</sup>]</b>
M20			6,2	2,4	1,5	0,5	
M21			6,2	2,4	1,5	0,5	
M22			6,2	2,4	1,5	0,5	
M23			6,2	2,4	1,5	0,5	
M24			6,2	2,4	1,5	0,5	
M25			6,2	2,4	1,5	0,5	
	<b>Sub- strat<sup>2</sup></b> <b>[g L<sup>-1</sup>]</b>	<b>SE-Lsg</b> <b>[mL L<sup>-1</sup>]</b>	<b>BME-Lsg</b> <b>[mL L<sup>-1</sup>]</b>	<b>L-Phe</b> <b>[mg L<sup>-1</sup>]</b>	<b>SP</b> <b>[g L<sup>-1</sup>]</b>	<b>CH</b> <b>[g L<sup>-1</sup>]</b>	<b>D<sub>7</sub>-ZS</b> <b>[g L<sup>-1</sup>]</b>
SNL-H		1,0					
M1		1,0	10,0				
M2	siehe Tabelle 5.5	1,0	10,0				
M3	WT <sub>u</sub> , AT, AT <sub>u</sub>		10,0				



	<b>Sub- strat<sup>2</sup> [g L<sup>-1</sup>]</b>	<b>SE-Lsg [mL L<sup>-1</sup>]</b>	<b>BME-Lsg [mL L<sup>-1</sup>]</b>	<b>L-Phe [mg L<sup>-1</sup>]</b>	<b>SP [g L<sup>-1</sup>]</b>	<b>CH [g L<sup>-1</sup>]</b>	<b>D<sub>7</sub>-ZS [g L<sup>-1</sup>]</b>
M4	WT <sub>u</sub> , AT <sup>3</sup> , AT <sub>u</sub>	1,0					
M5	AT, AT <sub>u</sub>	1,0	10,0				
M6	WT <sub>u</sub>	1,0	10,0				
M7	WT <sub>u</sub>						
M8		1,0		165			
M9	105 WT <sub>u</sub>	1,0	10,0				
M10	AT <sub>u</sub>	1,0	10,0				
M11	AT <sub>u</sub>	1,0	10,0				
M12	AT <sub>u</sub>	1,0	10,0				
M13	AT <sub>u</sub>	0,5	5,0				
M14	AT <sub>u</sub>	1,0	10,0	1.500			
M15	AT <sub>u</sub>	1,0	10,0		16,9		
M16	AT <sub>u</sub>	1,0	10,0			16,8	
M17	AT	1,0	10,0				
M18	AT	1,0	10,0				
M19	AT	1,0	10,0				
M20	AT	1,0	10,0				
M21	AT	1,0	10,0				
M22	AT	1,0	10,0				
M23	AT	1,0	10,0				
M24	AT	1,0	10,0				
M25	AT	1,0	10,0				0,15
	<b>L-Tyr [g L<sup>-1</sup>]</b>	<b>BA [mL L<sup>-1</sup>]</b>	<b>FA [mL L<sup>-1</sup>]</b>	<b>KS [mg L<sup>-1</sup>]</b>	<b>CS [g L<sup>-1</sup>]</b>	<b>CHS [g L<sup>-1</sup>]</b>	<b>ZS [g L<sup>-1</sup>]</b>
M18	1,8						
M19		1,06					
M20			0,21				
M21				0,18			
M22					0,16		
M23						0,35	
M24							0,15
M25							

<sup>1</sup>modifiziert nach (Sprecher 1959), <sup>2</sup>Abkürzung und Einwaage des jeweiligen Substrates siehe Tabelle 5.5

Tabelle 5.8: Zusammensetzung der Spurenelementlösung

Substanz	Konzentration [g L <sup>-1</sup> ]
FeCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,080
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,090
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0,030
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,005
EDTA	0,400

### 5.2.3.1 SNL-H-Agar

Für die Plattenkultivierung wurden dem SNL-H-Medium (Tabelle 5.7) vor dem Autoklavieren 15 g L<sup>-1</sup> Agar-Agar hinzugegeben.

## 5.2.4 Kulturbegleitende Analytik

### 5.2.4.1 Bestimmung des Gesamtkohlenhydratgehaltes

Der Gesamtkohlenhydratgehalt wurde photometrisch mittels Orcinol-Schwefelsäure-Assay (Chaplin und Kennedy 1994) bestimmt. Die konz. Schwefelsäure dient dazu, die Kohlenhydrate in der Probe zu hydrolysieren. Diese Hydrolyseprodukte reagieren mit Orcinol weiter zu gefärbten Verbindungen. Diese wurden im Anschluss photometrisch bestimmt. In Safelock-Eppendorfcups® (2 mL) wurden 10 mg Probe mit 2 mL 2 M HCl für zwei Stunden (100 ° C, 700 U min<sup>-1</sup>) erhitzt, um die festen Proben bereits partiell zu hydrolysieren. Anschließend wurden die Proben membranfiltriert. Eisgekühltes Orcinol wird in konzentrierter Schwefelsäure gelöst (2 g L<sup>-1</sup>). Das Reagenz wurde maximal eine Woche bei 4° C gelagert. Proben, Standards und Kontrollen (200 µL, 4° C) wurden mit 800 µL Reagenz vermischt und anschließend 15 min erhitzt (80° C). Die Proben wurden im Anschluss auf Eis abgekühlt (RT) und die Extinktionen bei 420 nm gemessen. Die Regressionsgrade wurde durch Auftragen der Extinktion (Ex.) von Glucose-Standardlösung (10 - 100 µg mL<sup>-1</sup>) gegen den Glucosegehalt (Glc-Konz.) ermittelt (Abbildung 5.1).

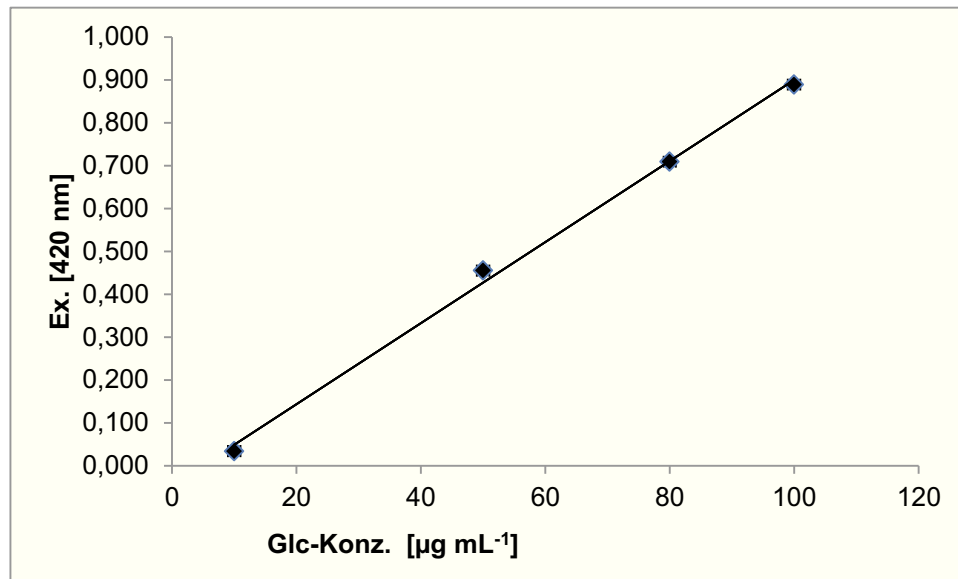


Abbildung 5.1: Kalibriergrade Orcinol-Schwefelsäure-Assay ( $y = 0,0095x - 0,0455$ ,  $R^2 = 0,9973$ )

#### 5.2.4.2 Bestimmung des Gesamtstickstoffgehaltes nach Kjeldahl

Der Gesamtstickstoffgehalt der Substrate Weintrester (Gewürztraminer) und Apfeltrester wurde nach Kjeldahl bestimmt (modifiziert nach der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren (ASU) Band I (L) L 15.00–3). Die Proben wurden mit konzentrierter Schwefelsäure unter Zusatz eines Katalysatorgemisches oxidativ aufgeschlossen. Durch Alkalizusatz wurde aus dem gebildeten Ammoniumsulfat Ammoniak freigesetzt, welches mit Hilfe einer Wasserdampfdestillation in eine borsäurehaltige Vorlage überführt und titrimetrisch mit einer Salzsäuremaßlösung bestimmt wurde. Der Proteingehalt wurde unter Berücksichtigung des durchschnittlichen Stickstoffgehalts der vorliegenden Proteinart bestimmt (verwendeter Faktor 6,25).

#### 5.2.4.3 Bestimmung der direkt reduzierenden Zucker und der reduzierenden Zucker nach Inversion nach Luff-Schoorl

Die Bestimmung der direkt reduzierenden Zucker erfolgte nach Luff-Schoorl (ASU Band I (L) L 31.00–11). Dazu wurde eine definierte Einwaage bzw. ein definiertes Volumen der Substrate in destilliertem Wasser suspendiert. Anschließend wurde eine Klärung nach Carrez durchgeführt und das Filtrat zur Bestimmung der direkt reduzierenden Zucker verwendet. Zur Bestimmung der reduzierenden Zucker nach Inversion wurde die Probe zuvor durch Zugabe von Salzsäure nach der deutschen Zollvorschrift invertiert.

## 5.2.5 Kultivierung der Basidiomyceten

### 5.2.5.1 Stammkultivierung

Von dem verwendeten Pilzstamm wurden jeweils zwei Stammkulturen auf Agarplatten mit SNL-H-Medium kultiviert. Hierfür wurde je eine SNL-H-Platte mit einem ca. 1 cm<sup>2</sup> großen, homogen mit Myzel bewachsenen Agarstück beimpft, mit Parafilm<sup>®</sup> verschlossen und im Brutschrank bei 24 °C kultiviert (Taubert *et al.* 2000). Wenn die Platten zur Hälfte mit Myzel bewachsen waren, wurden die Kulturen bei 4 °C gelagert. Diese Stammkulturen wurden in regelmäßigen Abständen überimpft.

### 5.2.5.2 Submerskultur im Schüttelkolben (Vorkultur)

Die Vorkultur wurde in SNL-H-Medium geführt (Tabelle 5.7). Ein ca. 1 cm<sup>2</sup> großes, homogen mit Myzel bewachsenes Agarstück (5.2.5.1), wurde steril in einen 250 mL-Erlenmeyerkolben mit 100 mL Medium überführt und mit einem Ultra-Turrax-Dispergiergerät für 15 s bei 9.800 U min<sup>-1</sup> homogenisiert. Die Kultivierung erfolgte für 4 bis 14 Tage im Inkubationsschüttler (Multitron, Infors, Einsbach; 24 °C, 150 U min<sup>-1</sup>, Auslenkung 25 mm) unter Lichtausschluss.

### 5.2.5.3 Submerskultur im Schüttelkolben (Hauptkultur)

Für die Hauptkultur (Pilz<sub>Substrat</sub>) und für die Blindwerte (Pilz<sub>BW</sub>, Substrat<sub>BW</sub>) wurden 100 mL Medium (Tabelle 5.7) in 250 mL-Erlenmeyerkolben vorgelegt. Die Pilz<sub>Substrat</sub>-Kultur wurde mit 10 mL einer homogenisierten (15 s, 9.800 U min<sup>-1</sup>) Vorkultur (5.2.5.2) angeimpft. Die Kultivierung erfolgte abhängig vom jeweiligen olfaktorischen Eindruck für vier bis zwölf Tage unter Lichtausschluss im Inkubationsschüttler (24 °C, 150 U min<sup>-1</sup>, Auslenkung 25 mm).

Für die Kultivierungen im Maßstab 0,4:1 und 4:1 wurden 40 mL bzw. 400 mL Medium M2 (Tabelle 5.7) in einem 100 mL- bzw. 1 L-Erlenmeyerkolben überführt und mit 4 mL bzw. 40 mL der homogenisierten Vorkultur (5.2.5.2) inokuliert. Die Kultivierung wurde für vier Tage unter Lichtausschluss im Inkubationsschüttler (24 °C, 150 U min<sup>-1</sup>, Auslenkung 25 mm) durchgeführt.

#### 5.2.5.4 Biotransformation von unbehandeltem Apfeltester im 7,5-L-Fermenter

##### Vorkultur

Die Anzucht der Vorkultur erfolgte analog zu 5.2.5.2

##### Hauptkultur

Für die Hauptkultur wurde das Medium M2 (Substrat AT<sub>u</sub>; Tabelle 5.7) verwendet. Der Bioreaktor (Tabelle 5.9) wurde mit 4 L bzw. 5 L Medium befüllt, autoklaviert und mit 400 mL bzw. 500 mL homogenisierter Vorkultur (5.2.5.2) inokuliert. Die Kulturdauer betrug vier Tage.

Tabelle 5.9: Bioreaktor, Infors, Einsbach

<b>Bioreaktor</b>	Labfors 3 (Infors, Einsbach)
<b>Nennvolumen Kulturgefäß</b>	7,5 L
<b>Druckluft</b>	Hausleitung (2,1 bar), sterilfiltriert über PTFE-Membranfilter (Sartorius, Midisart 2000, 0,2 µm)
<b>Abluft</b>	PTFE-Membranfilter (Sartorius, Midisart 2000, 0,2 µm) als Sterilbarriere
<b>Kulturparameter</b>	24 °C, 200 U min <sup>-1</sup> - 350 U min <sup>-1</sup>
<b>Belüftung</b>	Luftrohr (AD 8 mm), 0,3 L min <sup>-1</sup>
<b>pH-Elektrode</b>	Schott Steamline SL 80-325 pH

#### 5.2.6 Kulturbegleitende sensorische Analyse

Aus den Hauptkulturkolben (5.2.5.3) wurden jeden zweiten Tag je 4 mL Probe steril entnommen und in ein Schnappdeckelglas (20 mL) überführt. Die Probe wurde in einem Schüttelwasserbad (Wasserbad Typ WB 20mT, PD-Industriegesellschaft mbH, Dresden) auf 40 °C erwärmt und anschließend olfaktorisch evaluiert. Die Beurteilung wurde jeweils von mindestens drei Personen durchgeführt. Die Bewertung der Geruchsintensität erfolgte anhand einer Fünf-Punkte-Skala (1: keine bis geringe Intensität, 5: intensives, starkes Aroma). Anhand des vielversprechenden olfaktorischen Eindrucks und dessen Reproduzierbarkeit wurden die Biotransformationen für eine anschließende Analyse der Aromastoffe ausgewählt.

## 5.2.7 Molekularbiologische Identifizierung von Basidiomyceten

### 5.2.7.1 Isolierung der genomischen DNA

Für die Isolierung der genomischen DNA wurde das Nucleo Spin® Plant II Kit der Firma Macherey-Nagel verwendet. Ca. 100 mg Pilzmyzel wurden mit flüssigem Stickstoff gekühlt, unter Zugabe von 800 µL Lysepuffer (PL1) gemörsert und mit RNase sowie PC-Bindungspuffer versetzt. Der Ansatz wurde 30 min bei 65 °C inkubiert. Die weiteren Arbeitsschritte wurden gemäß des Handbuchs (Juli 2009, Rev. 03) durchgeführt. Die Elution der DNA erfolgte mit 50 µL 70 °C heißem Wasser. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mittels NanoDrop-ND 1000 Spektrophotometer der Firma Thermo. Die genomische DNA wurde anschließend bei -20 °C gelagert.

### 5.2.7.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Gewünschte DNA-Abschnitte zwischen zwei Oligonukleotidprimern wurden mittels PCR amplifiziert (Tabelle 5.10 und Tabelle 5.11).

*Tabelle 5.10: Verwendete ITS-Primer zur Amplifizierung der 5,8S ribosomalen Untereinheit mit ITS-Bereich*

Nr.	Name	Sequenz	Schmelztemperatur
1473	ITS4	5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'	58°C
1474	ITS5	5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG-3'	58°C

*Tabelle 5.11: PCR-Ansatz (100 µL)*

Substanz	Menge [µL]
Template	7 [entspricht ca. 100 ng]
10 x CoralLoad PCR-Puffer	10
dNTPs (je 10 mM)	2
ITS5 Primer fwd (10 µM)	4
ITS4 Primer rev (10 µM)	4
HOTStar Taq (5 U µL <sup>-1</sup> , QIAGEN, Hilden)	0,5
Wasser	72,5
E-pure-Wasser <i>ad</i> Endvolumen	100

Die Temperaturzyklen wurden in einem Thermocycler der Firma Analytik Jena durchgeführt.

### Cyclerprogramm

95 °C 6 min

30 Zyklen:

95 °C 60 s

50 °C 60 s

72 °C 2 min

72 °C 5 min

4 °C Abkühlung

### **5.2.7.3 Agarose-Gelelektrophorese**

Folgende Lösungen wurden für die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt.

#### 50x TAE-Puffer

Tris 242 gL<sup>-1</sup>

Essigsäure, konz. 57,1 mL L<sup>-1</sup>

0,5 M EDTA, pH 8 100,0 mL L<sup>-1</sup>

Der 50x TAE-Puffer wurde vor der Verwendung 1:50 mit VE-Wasser verdünnt (1x TAE-Puffer).

1,6% Agarose wurde in 1x TAE-Puffer suspendiert und bis zur vollständigen Lösung der Agarose in einer Mikrowelle erwärmt. Pro 10 mL Lösung (ca. 60 °C) wurden 1 µL 1%-Ethidiumbromidlösung hinzu pipettiert. Das Gel wurde in einem Gelschlitten der Firma PeqLab mit eingehängtem Kamm gegossen. Der Gelschlitten wurde horizontal in eine Elektrophoresekammer eingesetzt und die Kammer mit 1x TAE-Puffer gefüllt. Die mit dem CoralLoad PCR-Puffer (QIAGEN, Hilden) versetzten PCR-Proben wurden direkt auf das Gel aufgetragen. Der 10 x CoralLoad PCR-Puffer diente gleichzeitig als Ladepuffer. Daraufhin erfolgte die Gelelektrophorese bei 80 V. Die Fragmentgröße wurde anhand eines Standards (100 bp DNA extended DNA-Leiter für PCR-Amplifikate, Carl Roth) ermittelt. Die Detektion der DNA erfolgte unter UV-Licht. Die Geldokumentation wurde mit einer Anlage der Firma Decon Science Tec (Hohengandern) die mit einem UV-Transilluminator (312 nm), einer digitalen Kamera und der Software DeVision G Vers. 2.0 ausgestattet war, durchgeführt. Die entsprechende Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und die enthaltene DNA wurde mittels Nucleo Spin<sup>®</sup> Extract II extrahiert.

#### 5.2.7.4 Sequenzierung

Die Sequenzierung der genomischen DNA wurde von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchgeführt und erfolgte nach der Kettenabbruch-Methode. Die Sequenzen wurden mit dem Programm Chromas Lite 2.01 analysiert. Anschließend wurde mit den Sequenzen eine Datenbankrecherche beim *European Bioinformatics Institute* (EBI-EMBL) mittels BLAST-Algorithmus durchgeführt (Altschul *et al.* 1990, Altschul *et al.* 1997).

### 5.2.8 Gaschromatographie

#### 5.2.8.1 Flüssig/flüssig-Extraktion

Die Hauptkultur (5.2.5.3) wurde abhängig von der Beschaffenheit der Kulturbrühe zentrifugiert (10 min, RT, 4.000 U min<sup>-1</sup>, 3.724 x g) und der gesamte Kulturüberstand dreimal mit dem gleichen Volumen Pentan/Diethylether, 1/1,12; v/v extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, mittels Vigreux-Kolonne auf ca. 1 mL eingengt und mit 100 µL Internem Standard (750 mg L<sup>-1</sup> Thymol in Pentan/Diethylether, 1/1,12; v/v) versetzt. Bei den Fermentationen von unbehandeltem Apfeltrester durch *T. chioneus* in den Medien M3, M5, M11 und M13 im Vergleich zum Referenzmedium (M2) erfolgte die Zugabe von 100 µL Internem Standard (750 mg L<sup>-1</sup> in Methanol) in die Kulturbrühe. Zur gaschromatographischen Analyse (5.3.2.2) wurde 1 µL der Probe verwendet (Tabelle 5.12, Tabelle 5.13).

Bei der Untersuchung mittels Gaschromatographie-Olfaktometrie (GC/O) wurde der am Olfaktometriedetektorport (ODP) wahrgenommene Geruchseindruck mittels eines Signalgebers dokumentiert (ODP-Spur). Die Stärke des Signals entsprach der wahrgenommenen Intensität auf einer Skala von 1 - 4 (1: 25 pA, 2: 50 pA, 3: 75 pA, 4: 100 pA). „1“ entsprach der niedrigsten, „4“ der höchsten Intensität. Die Breite des Signals stellte die Dauer des Gerucheindrucks dar.

Die Retentionsindizes (KI) der Analyten wurden nach Kováts bestimmt (Kováts 1958)



Tabelle 5.12: Geräteparameter GC/O nach flüssig/flüssig-Extraktion

<b>Gaschromatograph</b>	Agilent 7890A
<b>Injektor</b>	cold on-column
<b>Injektionsvolumen</b>	1 µL
<b>Trennsäule</b>	Agilent Technologies J&W Scientific HP-Innowax, 30 m x 0,32 mm ID, 0,25 µm Filmdicke
<b>Detektor</b>	FID, 250 °C; Gase: H <sub>2</sub> : 40 mL min <sup>-1</sup> , Luft: 400 mL min <sup>-1</sup> , N <sub>2</sub> : 25 mL min <sup>-1</sup>
<b>Olfaktometrieport</b>	Gerstel ODP 3; Transferline: 250 °C, Mischraumheizung: 150 °C, Makeupgas: N <sub>2</sub>
<b>Trärgas</b>	H <sub>2</sub> Fluss: 2,0 mL min <sup>-1</sup> (konstant)
<b>Temperaturprogramm</b>	40 °C (3 min), 5 °C min <sup>-1</sup> auf 240 °C (12 min)
<b>Software</b>	Chemstation B.04.01

Tabelle 5.13: Geräteparameter GC/MS nach flüssig/flüssig-Extraktion

<b>Gaschromatograph</b>	Agilent 7890A
<b>Injektor</b>	split/splitless, 250 °C
<b>Splitverhältnis</b>	1:10 oder 1:5
<b>Injektionsvolumen</b>	1 µL
<b>Trennsäule (polar)</b>	Agilent Technologies J&W Scientific HP-Innowax, 30 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke
<b>Trennsäule (unpolar)</b>	Agilent Technologies DB-5MS, 30 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke
<b>Detektor</b>	Agilent 5975 C MSD Triple-Axis-Detektor
<b>Massenbereich</b>	m/z 33-300
<b>Temperaturen</b>	Ionenquelle: 230 °C, Interface: 250 °C, Quadrupol: 150 °C
<b>Trärgas</b>	He Fluss: 1,2 mL min <sup>-1</sup> (konstant)
<b>Software</b>	ChemStation MSD E.02.00.493
<b>Datenbank</b>	NIST 2008 MS LIB
<b>Temperaturprogramm (flüssig, HP-Innowax)</b>	40 °C (3 min), 5 °C min <sup>-1</sup> auf 240 °C (12 min)
<b>Temperaturprogramm (flüssig, DB-5)</b>	40 °C (3 min), 5 °C min <sup>-1</sup> auf 240 °C (12 min), 20 °C min <sup>-1</sup> auf 300 °C (7 min)

### 5.2.8.2 Headspace Festphasenmikroextraktion (HS-SPME)

Kulturbegleitend zur Biotransformation  $\text{WCO}_{\text{WTU}}$  und  $\text{TCH}_{\text{AT}}$  im Maßstab 4:1 wurden jeden Tag 4 mL Kulturbrühe mit 400 mg NaCl in ein 10-mL-Headspace (HS)-Vial (Vial: 46 x 22,5 mm, Klarglas, HS 200095, Achroma Olivier Hoffrath GmbH, Mühlheim; HS-Kappen: Aluminium Bördelkappen mit Silicon/PTFE, N20 TS/oA, Omnilab) überführt und mit 10  $\mu\text{L}$  Internem Standard (Thymol 75 mg  $\text{L}^{-1}$  Methanol) versetzt. Das Probengefäß wurde verschlossen und in einem Wasserbad temperiert (60 °C). Die Extraktionsdauer der SPME betrug 40 min. Desorbiert wurde im S/SL-Injektor (Eindringtiefe 4 cm) des Gaschromatographen (Tabelle 5.14 und Tabelle 5.15).

Tabelle 5.14: Parameter der HS-SPME-Extraktion

<b>Probenvolumen</b>	4 mL + 400 mg NaCl
<b>Extraktionsdauer</b>	40 min
<b>Temperatur im HS-Vial</b>	50 °C und 60 °C
<b>Eindringtiefe der Nadel ins HS-Vial</b>	1 cm
<b>Faser</b>	DVB/CAR/PDMS (50/30 $\mu\text{m}$ Schichtdicke, 1 cm Faserlänge, Supelco, München)

Tabelle 5.15: Geräteparameter GC/MS nach SPME

siehe	Tabelle 5.13
<b>Splitverhältnis</b>	splitless (5 min)
<b>Temperaturprogramm (SPME, HP-Innowax)</b>	40 °C (3 min), 5 °C $\text{min}^{-1}$ auf 240 °C (7 min)

### 5.2.8.1 Identifizierung der Aromastoffe

Die Identifizierung der geruchsaktiven flüchtigen Verbindungen erfolgte anhand von Referenzsubstanzen sowie dem Vergleich von gaschromatographischen und massenspektrometrischen Daten mit Literaturwerten. Die Analysen erfolgten sowohl an einer polaren als auch an einer unpolaren Säule. Der Vergleich der massenspektrometrischen Daten erfolgte mittels der Datenbank NIST 2008 MS LIB.

### Berechnung des Retentionsindex

Um die ermittelten Retentionszeiten systemunabhängig mit Literaturwerten zu vergleichen, wurden Kováts-Indizes (KI) anhand der Formel (5.1) von Kováts (1958) bestimmt.

$$KI = 100 \times z + 100 \frac{\log t_{R'x} - \log t_{R'z}}{\log t_{R'z+1} - \log t_{R'z}}$$

- z: Anzahl der C-Atome des Alkans, das vor dem Analyten eluiert  
 $t_{R'x}$ : Netto-Retentionszeit des Analyten  
 $t_{R'z}$ : Netto-Retentionszeit des Alkans, das vor dem Analyten eluiert  
 $t_{R'z+1}$ : Netto-Retentionszeit des Alkans, das nach dem Analyten eluiert

(5.1)

### Quantifizierung der Hauptaromakomponenten

Die Konzentration der Analyten wurde mit Hilfe des Internen Standards Thymol ermittelt. Ein *response factor* (Rf) wurde für jeden Analyten bestimmt (5.2) und zur Quantifizierung der Biotransformationsprodukte und Hauptaromakomponenten verwendet (5.3), siehe Tabelle 7.94).

$$Rf = \frac{A_{IS} \cdot m_a}{m_{IS} \cdot A_a}$$

- A: Peakfläche  
 m: Masse  
 IS: Interner Standard  
 a: Analyt

(5.2)

$$m_a = Rf \cdot m_{IS} \cdot \frac{A_a}{A_{IS}}$$

- A: Peakfläche  
 m: Masse  
 IS: Interner Standard  
 a: Analyt

(5.3)

### 5.2.9 Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA)

Der Extrakt (5.2.8.1) wurde so lange mit Pentan/Diethylether (1/1,12; v/v) 1+1 (v/v) verdünnt bis keine Aromastoffe am Olfaktometriepot mehr wahrgenommen wurden. Für jede aromaaktive Substanz wurde der Verdünnungsfaktor (*flavor dilution* (FD)-Faktor) bestimmt und gegen den Kováts-Retentionsindex aufgetragen (FD-Chromatogramm). Die AEVA wurde von mindestens zwei Personen unabhängig voneinander durchgeführt. Aromawerte wurden für die Hauptaromakomponenten ermittelt (5.4). Der Aromawert ist proportional zum Beitrag, den eine Substanz zum Aroma leistet (Grosch 1990).

$$A = \frac{c}{a}$$

A: Aromawert (5.4)

c: Konzentration des Aromastoffes

a: Geruchsschwellenwert des Aromastoffes in Wasser

### 5.2.10 Abtrennung der durch Fermentation von unbehandeltem Apfeltrester durch *T. chioneus* gewonnenen Aromastoffe mittels Pervaporation

Die Pervaporationsexperimente wurden in einer Pervaporationsanlage im Labormaßstab durchgeführt (Abbildung 5.2).

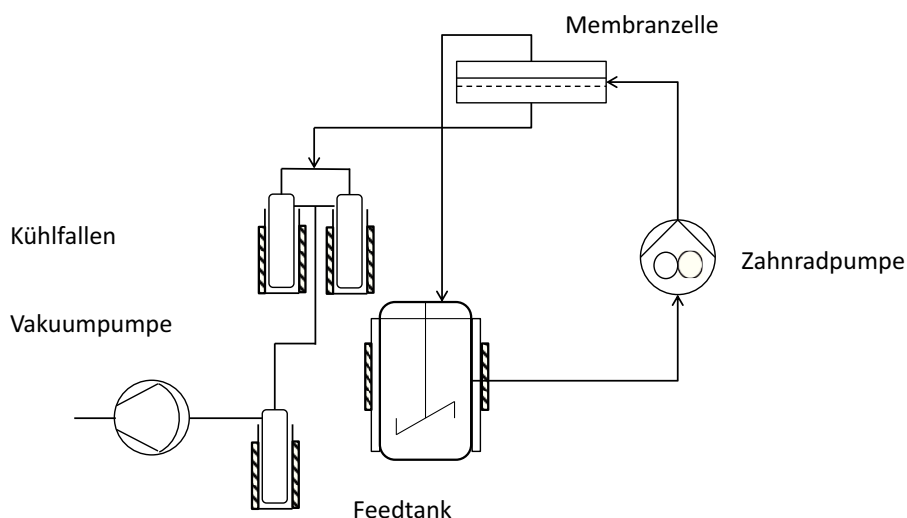


Abbildung 5.2: Schema der Pervaporationsanlage

Für die Kultivierung im Maßstab 50:1 wurden 5 L Minimalmedium mit unbehandeltem Apfeltrester ( $112 \text{ gL}^{-1}$ ) im 7,5 L-Rührkesselreaktor verwendet (5.2.5.4). Die Kultivierung erfolgte unter Lichtausschluss für 4 Tage im Fermenter. Der Kulturüberstand wurde über einen Cellulosefilter (MN 615  $\frac{1}{4}$   $\varnothing = 185 \text{ mm}$  REF 531018, Macherey-Nagel GmbH + Co. KG, Düren) für die nachfolgende Pervaporation aufbereitet. Vor Versuchsbeginn wurde die Anlage einmal mit dem filtrierten Kulturüberstand gespült. Die PDMS-Membran (Durchmesser 130 mm, PervapTM 4060, Sulzer ChemTech, Schweiz) wurde in die flache, runde Membranzelle platziert (effektiven Membranfläche:  $104 \text{ cm}^2$ ). Im Feedtank wurde 1 L Kulturüberstand auf  $35\text{--}40^\circ \text{ C}$  temperiert. Die Feedflussrate betrug  $35 \text{ L h}^{-1}$  und das Retentat wurde in den Feedtank rezirkuliert. Feedproben (4 mL) wurden am Anfang und am Ende der Experimente entnommen. Der Permeatdruck wurde auf 10 mbar eingestellt (Tabelle 5.16). Das Permeat wurde in Kühlfallen (Trockeneis und Isopropanol) bei Temperaturen unter  $-65^\circ \text{ C}$  gesammelt. Der filtrierte Kulturüberstand und die entnommenen Fraktionen wurden im Anschluss mittels flüssig/flüssig Extraktion und HS-SPME analysiert (siehe 5.2.8). Der Trennfaktor wurde nach Formel (5.5) ermittelt.

$$S = \frac{c_p}{c_f}$$

S: Trennfaktor (5.5)

$c_p$ : Konzentration im Permeat

$c_f$ : Konzentration im Feed

*Tabelle 5.16: Parameter der Pervaporation der Kultivierung von T. chioneus mit unbehandeltem Apfeltrester (Maßstab 50:1)*

<b>Probenvolumen</b>	1 L filtrierter Kulturüberstand
<b>Extraktionsdauer</b>	4-5 h
<b>Temperatur</b>	$35\text{--}40^\circ \text{ C}$
<b>Permeatdruck</b>	10 mbar
<b>Probe</b>	<i>T. chioneus</i> kultiviert mit unbehandeltem Apfeltrester
<b>Membran</b>	PervapTM 4060, Sulzer ChemTech, Switzerland, Durchmesser 130 mm)

## 5.2.11 Sensorische Methoden

### 5.2.11.1 Bestimmung des Geruchsschwellenwertes

3-Phenylpropanal (41,48 mg) und 3-Phenylpropanol (31,48 mg) wurden in 100 mL Ethanol (reinst) gelöst. 6 mL dieser Standardlösungen wurden in einen 1 L-Messkolben überführt und mit abgekochtem Wasser *ad* Marke aufgefüllt. Die Geruchsneutralität des Ethanol/Wassergemisches wurde zuvor von mehreren Personen überprüft. Im Folgenden wurde die Anfangskonzentration zehnmal um die Hälfte in saubere Messkolben verdünnt. Die Endverdünnung wies keinen Geruchseindruck auf. Zur Prüfung wurden elf Proben beginnend mit der niedrigsten Konzentration (aufsteigend) in ausgeglühten Schnapdeckelgläsern eingesetzt. Es wurde so viel Lösung (10 mL) verwendet, dass ausreichend Kopfraum zum Riechen zur Verfügung stand. Die Probanden (13 bzw. 23 Personen) rochen die Riechgefäße ab und füllten den Prüfbogen (Abbildung 5.3) aus. Die Proben wurden nur einmal geöffnet und Rückprüfung war nicht zulässig. Nach §64 LMBG, ASU Band I (L) Methode 00.90-7 und 00.90-9 wurde der nasale Schwellenwert aus dem Schwellenwerten der einzelnen Prüfpersonen ermittelt (5.6). Die Wahrnehmungsschwelle der Prüfgruppe wurde mit Hilfe des quadratischen Mittels berechnet (5.7).

$$W = \sqrt{C_s \cdot C_{s+1}}$$

W: Wahrnehmungsschwelle (5.6)

$C_s$ : Konzentration der letzten wahrgenommenen Probe

$C_{s+1}$ : Konzentration der ersten nicht wahrgenommenen Probe

$$S_W = \sqrt[n]{\prod_{i=1}^n W_i}$$

$S_W$ : Wahrnehmungsschwelle der Prüfgruppe (5.7)

n: Anzahl der Prüfer

$W_i$ : Wahrnehmungsschwelle der einzelnen Prüfpersonen

$\prod_{i=1}^n W_i$ : Produkt der Wahrnehmungsschwellen der einzelnen Prüfpersonen

<b>Prüfmuster: Aromastoff in wässriger Lösung</b>		<b>Datum:</b>											
<b>Prüfaufgabe:</b>		<b>Prüfperson Name</b>						<b>Prüfperson Codierung</b>					
Sie erhalten eine Reihe Proben mit Prüflösungen.  Beginnen sie das Riechen mit der Neutralprobe (0-Probe).  Danach öffnen sie mit Probe 1 beginnend jede Probe nacheinander nur <b><u>EINMAL</u></b> .													
Unter Verwendung der Notationssymbole  0 = kein Geruch bzw. kein Unterschied zum Medium ? = Geruch unterschiedlich zur Probe davor (Reizschwelle) ohne Erkennung X = Geruch erkannt (mit Nennung) xx, xxx = erkannter Konzentrationsunterschied  ist das Ergebnis sofort einzutragen													
Reihenfolge der Darreichung	0-Probe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
Nr. der Prüfprobe													
Notationssymbol Geruch													

Abbildung 5.3: Prüfprotokoll zur Bestimmung des Reizschwellenwertes nach Geruch

### 5.2.11.2 Aromamodell

Als Matrix für die Aromamodelle im Vergleich zu den Kulturbrühen wurde das Referenzmedium M2 ohne Substrat verwendet. Die authentischen Standards wurden in Propan-1,2-diol gelöst und entsprechend der quantifizierten Gehalte der Biotransformationen gemischt (Tabelle 5.18 und Tabelle 5.20). In braune Sensorikflaschen mit Weithalsöffnung wurden 10 mL des Aromamodells, welches im Referenzmedium M2 ohne Substratgabe durchgeführt wurde, gefüllt und von mindestens fünf geschulten Personen olfaktorisch gegen die entsprechenden Kulturbrühen evaluiert und nach einer 5-Punkte-Skala bezüglich ihrer Intensität bewertet (5.2.6).

Pentan/Diethylether (1/1,12 v/v) wurde als Matrix für die Aromamodelle im Vergleich zu den Aromaextrakten der favorisierten Biotransformationen gewählt. Die authentischen Standards wurden in Pentan/Diethylether entsprechend der quantifizierten Gehalte zusammengesetzt (Tabelle 5.17, Tabelle 5.19 und Tabelle 5.21). In 4 mL-Braunglasvials mit Schraubdeckel wurde 1 mL des Aromamodells in Pentan/Diethylether überführt und mit einem ca. 1 cm breiten und ca. 4 cm hohen Filterpapier bestückt. Auch dieses Modell wurde gegen die Aromaextrakte der Biotransformationen von mindestens fünf geschulten Personen olfaktorisch evaluiert.

Tabelle 5.17: Aromastoffzusammensetzung für das Aromamodell der Biotransformation von Weintresterpresskuchen durch *T. chioneus* in Pentan/Diethylether

Aromastoff	Aroma-wert <sup>a</sup>	Extrakt [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ] <sup>b</sup>	Stammlösung in Pentan/Diethylether [ $\text{mg mL}^{-1}$ ]	Zugabe zu Pentan/Diethylether [ $\mu\text{L (10mL)}^{-1}$ ]
3-Phenylpropanal	98	24	1,6	155
3-Phenylpropanol	11	8	1,4	54
Phenylelessigsäure-methylester	2	8	1,5	49
1H-Pyrrol-2-carboxaldehyd		5	1,2	41

a: berechnet durch Division der Aromastoffkonzentration in  $\mu\text{g L}^{-1}$  durch den Geruchsschwellenwert

b: quantifizierter Gehalt der angegebenen Aromastoffe in dem Aromaextrakt

Tabelle 5.18: Aromastoffzusammensetzung für das Aromamodell der Biotransformation von Weintresterpresskuchen durch *W. cocos* im Referenzmedium M2 ohne Substratgabe

Aromastoff	Aroma-wert <sup>a</sup>	Kultur [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ] <sup>b</sup>	Stammlösung in Medium M2 [ $\text{mg mL}^{-1}$ ]	Zugabe in Medium M2 [ $\mu\text{L L}^{-1}$ ]
(E)-Geraniol	4	159	3,6	44
2-Phenylethanol	15	2071	4,8	429

a: berechnet durch Division der Aromastoffkonzentration in  $\mu\text{g L}^{-1}$  durch den Geruchsschwellenwert

b: quantifizierter Gehalt der angegebenen Aromastoffe in der Biotransformation

Tabelle 5.19: Aromastoffzusammensetzung für das Aromamodell der Biotransformation von Weintresterpresskuchen durch *W. cocos* in Pentan/Diethylether

Aromastoff	Aroma-wert <sup>a</sup>	Extrakt [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ] <sup>b</sup>	Stammlösung in Pentan/Diethylether [ $\text{mg mL}^{-1}$ ]	Zugabe zu Pentan/Diethylether [ $\mu\text{L (10mL)}^{-1}$ ]
(E)-Geraniol	4	13	1,5	86
2-Phenylethanol	15	172	7,0	247

a: berechnet durch Division der Aromastoffkonzentration in  $\mu\text{g L}^{-1}$  durch den Geruchsschwellenwert

b: quantifizierter Gehalt der angegebenen Aromastoffe in dem Aromaextrakt

Tabelle 5.20: Aromastoffzusammensetzung für das Aromamodell der Biotransformation von lyophilisiertem Apfeltrester durch *T. chioneus* im Referenzmedium M2 ohne Substratgabe

Aromastoff	Aroma-wert <sup>a</sup>	Kultur [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ] <sup>b</sup>	Stammlösung in Medium M2 [ $\text{mg mL}^{-1}$ ]	Zugabe in Medium M2 [ $\mu\text{L L}^{-1}$ ]
Benzaldehyd	5	160	31,8	50
3-Phenylpropanal	94	291	2,8	103
Benzylalkohol	17	96	3,3	29
3-Phenylpropanol	30	266	3,5	76

a: berechnet durch Division der Aromastoffkonzentration in  $\mu\text{g L}^{-1}$  durch den Geruchsschwellenwert

b: quantifizierter Gehalt der angegebenen Aromastoffe in der Biotransformation



Tabelle 5.21: Aromastoffzusammensetzung für das Aromamodell der Biotransformation von lyophilisiertem Apfeltrester durch *T. chioneus* in Pentan/Diethylether

Aromastoff	Aroma- wert <sup>a</sup>	Extrakt [µg mL <sup>-1</sup> ] <sup>b</sup>	Stammlösung in Pentan/Diethylether [mg mL <sup>-1</sup> ]	Zugabe zu Pentan/Diethylether [µL mL <sup>-1</sup> ]
Benzaldehyd	5	13	0,9	14
3-Phenylpropanal	94	23	1,1	20
Benzylalkohol	17	9	1,1	8
3-Phenylpropanol	30	21	1	22

a: berechnet durch Division der Aromastoffkonzentration in µg L<sup>-1</sup> durch den Geruchsschwellenwert

b: quantifizierter Gehalt der angegebenen Aromastoffe in dem Aromaextrakt

## 5.3 Entwicklung neuartiger Getränke durch den Einsatz von essbaren Basidiomyceten

### 5.3.1 Substrate und Mikroorganismen

#### 5.3.1.1 Verwendete Mikroorganismen

Die verwendeten Mikroorganismen (Tabelle 5.22) wurden über das CBS und die DSMZ bezogen.

Tabelle 5.22: Im Screening eingesetzte Basidiomyceten mit Herkunft, Stammnummer und Abkürzung; S = Speisepilz (essbar mit kulinarischem Wert), E = essbar (ungiftig), M = Medizinalpilz, n.b. = nicht bekannt

Organismus	Trivialname	Herkunft	Stamm- nummer	Abk.	Einteilung
1 <i>Ischnoderma benzoinum</i>	Schwarzgebänderter Harzporling	CBS	311.29	IBE	S
2 <i>Pleurotus citrinopileatus</i>	Zitronenseitling	DSMZ	5341	PCI	S
3 <i>Pleurotus eryngii</i>	Kräuterseitling	DSMZ	8264	PER	S
4 <i>Pleurotus sapidus</i>		DSMZ	8266	PSA	S
5 <i>Polyporus tuberaster</i>	Sklerotien Porling	CBS	442.85	PTU	S
6 <i>Tyromyces chioneus</i>	Kurzhöhriger Saftporling	DSMZ	5242	TCH	M
7 <i>Wolfiporia cocos</i>	Lu Fing, Indian Bread	CBS	279.55	WCO	E

### 5.3.1.2 Verwendete Substrate für die Getränkeherstellung

Bei den zu fermentierenden Getränken Reisdrink, Haferdrink und Sojadrink wurden handelsübliche Produkte ([www.purenature.de](http://www.purenature.de)) verwendet. Die Getränke wurden ohne weitere Zusätze wie Zucker oder Vitamin C erworben. Die Herstellung der Bierwürze erfolgte in Kooperation mit der Technischen Hochschule Mittelhessen (Tabelle 5.23).

*Tabelle 5.23: Verwendete Substrate für die Getränkeherstellung*

<b>Substrat</b>	<b>Hersteller</b>
Haferdrink natural (HD)	Natumi, Eitorf
Reisdrink natural (RD)	Natumi
Sojadrink natural (SD)	Natumi
gehopfte Bierwürze (BWZ)	Technische Hochschule Mittelhessen
ungehopfte Bierwürze (BWZu)	Technische Hochschule Mittelhessen

### 5.3.2 Herstellung der Bierwürze

Die verwendete Bierwürze wurde am Institut für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische Technologie der Technischen Hochschule Mittelhessen hergestellt.

Für die Bierwürzen wurden 5,5 kg Malz (Pilsner Malz (4,5 kg), Münchener Malz (0,66 kg), Weizenmalz (0,33 kg), Weyermann, Bamberg) geschrotet, mit 20 L Wasser eingemaischt und unter ständigem Rühren erhitzt. Bei 55° C wurde die Eiweißrast für 15 min, bei 64° C die Maltoserast für 40 min und abschließend die Verzuckerungsrast bei 72° C für 20 min eingelegt (Abbildung 5.4). Zur vollständigen Endverzuckerung wurde die Temperatur für 20 Minuten auf 78° C eingestellt. Im Läuterbottich wurde die Würze solange über den Filterkuchen aus Malztreber gegeben, bis eine homogene, halbklare Flüssigkeit gewonnen wurde.



*Abbildung 5.4: Herstellung der Bierwürze am Institut für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische Technologie der Technischen Hochschule Mittelhessen,*

Der Stammwürzegehalt betrug ca. 11° Plato. Die halbklaare Würze wurde dann auf 100 °C erhitzt und 70 min gekocht. Bei der gehopften Bierwürze wurde 10 min nach Kochbeginn 28 g Bitterhopfen (Perle, 7,3%  $\alpha$ -Säure, Hallertau 2010) und 10 min vor Kochende 14 g Aromahopfen (Tradition, 6,8%  $\alpha$ -Säure, Hallertau 2010) hinzugefügt. Die Trübstoffe wurden mittels Whirlpool entfernt. Nach kurzem, starken Rühren und Ruhenlassen wurde die klare Würze abgelassen. Im noch heißen Zustand wurden die Würzen in PET-Flaschen abgefüllt und anschließend bei -20 °C gelagert.

### **5.3.3 Kulturbegleitende Analytik**

#### **5.3.3.1 Bestimmung des Gesamtstickstoffgehaltes nach Kjeldahl**

Die Bestimmung des Gesamtstickstoffgehaltes erfolgte gemäß Kapitel 5.2.4.2.

#### **5.3.3.2 Bestimmung des Gesamtfettgehaltes nach Weilbull-Stoldt**

Ein definiertes Volumen der eingesetzten flüssigen Substrate Sojadrink, Reisdink und Haferdrink wurde mit Salzsäure aufgeschlossen und das Fett mittels Filtration abgetrennt. Der Filterrückstand wurde mit heißem Wasser chloridfrei gewaschen, getrocknet und in der Soxhlet-Apparatur mit Petrolether (tiefsiedend) extrahiert. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert, der Rückstand getrocknet und ausgewogen (ASU Band I (L) L 01.00–20).

#### **5.3.3.3 Bestimmung der direkt reduzierenden Zucker und der reduzierenden Zucker nach Inversion nach Luff-Schoorl**

Der Gehalt an direkt reduzierenden Zucker und der Gesamtzuckergehalt wurden nach Kapitel 5.2.4.3 ermittelt.

### 5.3.4 Kultivierung der Basidiomyceten

#### 5.3.4.1 Stammkultivierung

Die Stammkultivierung erfolgte entsprechend Kapitel 5.2.5.1.

#### 5.3.4.2 Submerskultur im Schüttelkolben (Vorkultur)

Die Vorkultivierung der Basidiomyceten erfolgte gemäß Kapitel 5.2.5.2.

#### 5.3.4.3 Submerskultur im Schüttelkolben (Hauptkultur) für die Getränkeherstellung

Für die Hauptkultur (Pilz<sub>Substrat</sub>) und für den Substratblindwert (Substrat<sub>BW</sub>) wurden 100 mL des ausgewählten Substrates (Tabelle 5.23) in 250-mL-Erlenmeyerkolben steril vorgelegt. Die Pilz<sub>Substrat</sub>-Kulturen wurden mit 10 mL Vorkultur angeimpft. 10 mL der Vorkultur wurden zweimal mit Reinstwasser gewaschen und zentrifugiert (4.000 rpm, 2.880 x g, 5 min, 21 °C). Die Pellets der Vorkultur wurden in 10 mL Substrat (Tabelle 5.23) suspendiert und in 100 mL des entsprechenden, vorgelegten Substrates überführt. Die Kultivierung erfolgte unter Lichtausschluss für bis zu 27 h im Inkubationsschüttler (24 °C, 150 U min<sup>-1</sup>, Auslenkung 25 mm).

### 5.3.1 Kulturbegleitende sensorische Analyse der Getränkefermentation

Das Screening der Basidiomyceten für die Getränkeherstellung wurde in zwei Phasen durchgeführt. In Phase 1 wurde der olfaktorische Eindruck der Fermentationen analysiert. In Phase 2 wurden die bevorzugten Kulturen aus Phase 1 gustatorisch evaluiert und die Reproduzierbarkeit geprüft.

#### 5.3.1.1 Phase 1 (olfaktorische Bewertung)

Die Kulturführung erfolgte in Einfachbestimmung. Nach zwei, vier, sechs, acht, zehn und 24 h wurden 4 mL jeder Kultivierung zur olfaktorischen Beurteilung steril entnommen, in ein Schnappdeckelglas (20 mL) überführt und auf 8 °C temperiert. Die Bewertung der Geruchsintensität erfolgte anhand einer Fünf-Punkte-Skala (siehe 5.2.6).

#### 5.3.1.2 Phase 2 (gustatorische Bewertung)

In der zweiten Phase des Screenings wurden die bevorzugten Fermentationen der Phase 1 (5.3.1.1) in einem Panel von mindestens drei geschulten Mitarbeitern gustatorisch evaluiert (Abbildung 5.5). Die Kulturführung erfolgte hier in Doppelbestimmung. Zum bevorzugten Zeitpunkt, sowie eine Stunde zuvor und eine Stunde danach wurden

jeweils 8 mL Kultur entnommen, das Myzel abzentrifugiert (4.000 rpm, 2.880 x *g*, 5 min, 21 °C) und die Proben (8 °C) verkostet.



Abbildung 5.5: Verkostung der Fermentation von ungehopfter Bierwürze durch *W. cocos*

## 5.3.2 Gaschromatographie

### 5.3.2.1 Flüssig/flüssig-Extraktion

Die Extraktion der fermentierten Getränke wurde nach Kapitel 5.2.8.1 durchgeführt.

### 5.3.2.2 Gaschromatographische Methoden nach flüssig/flüssig-Extraktion

Die Durchführung der gaschromatographischen-olfaktometrischen und gaschromatographischen-massenspektrometrischen Analytik (Tabelle 5.24) erfolgte gemäß Kapitel 5.2.8.

Tabelle 5.24: Geräteparameter GC/MS nach flüssig/flüssig-Extraktion

<b>siehe Tabelle 5.13</b>	
<b>Temperaturprogramm (flüssig, HP-Innowax)</b>	40 °C (3 min), 5 °C min <sup>-1</sup> auf 240 °C (12 min)
<b>Temperaturprogramm (flüssig, DB-5)</b>	40 °C (3 min), 5 °C min <sup>-1</sup> auf 240 °C (12 min), 20 °C min <sup>-1</sup> auf 300 °C (7 min)

### 5.3.2.3 Identifizierung der Aromastoffe

Die Aromastoffe wurden gemäß Kapitel 5.2.8.1 identifiziert.

## **5.4 Entsorgung**

### **5.4.1 Biologisches Material**

Vor der Entsorgung wurden sämtliche Kulturen und Kulturreste durch Autoklavieren sterilisiert. Das Medium wurde filtriert und in das Laborabwasser gegeben. Feste Bestandteile wurden in den Laborabfall überführt.

### **5.4.2 Lösungsmittel und Chemikalien**

Der Verbrauch organischer Lösungsmittel wurde durch destillatives Reinigen und Wiederverwenden auf ein Minimum reduziert. Nicht wiederverwendbare Lösungsmittelreste und andere Chemikalienabfälle wurden nach folgenden Gruppen gesammelt:

- Organische Abfälle
- Anorganische Säuren

Alle Chemikalienabfälle und Lösungsmittel wurden der zentralen Entsorgung der Justus-Liebig-Universität Gießen zugeführt.

## 6 Literatur

**Abbott N, Etievant P, Issanchou S, Langlois D** (1993) Critical evaluation of two commonly used techniques for the treatment of data from extract dilution sniffing analysis. J Agric Food Chem 41:1698-1703.

**Abraham BG, Berger RG** (1994) Higher fungi for generating aroma components through novel biotechnologies. J Agric Food Chem 42:2344-2348.

**Adedeji J, Hartman TG, Rosen RT, Ho C** (1991) Free and glycosidically bound aroma compounds in hog plum (*Spondias mombins* L.). J Agric Food Chem 39:1494-1497.

**Agger S, Lopez-Gallego F, Schmidt-Dannert C** (2009) Diversity of sesquiterpene synthases in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. Mol Microbiol 72:1181-1195.

**Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ** (1990) Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215:403-410

**Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 25:3389-3402

**Amoore JE, Hautala E** (1983) Odor as an aid to chemical safety: odor thresholds compared with threshold limit values and volatilities for 214 industrial chemicals in air and water dilution. J Appl Toxicol 3:272-90.

**Amtliche Methoden für die Untersuchung von Lebensmitteln**  
Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (vormals § 35 LMBG), Band I (L), L 31.00-11, Bestimmung des Zuckergehaltes vor und nach Inversion in Fruchtsäften (Luff-Schoorl-Methode). Ausgabedatum: 1984-11.

**Amtliche Methoden für die Untersuchung von Lebensmitteln**  
Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (vormals § 35 LMBG), Band I (L), L 01.00-20: Bestimmung des Fettgehaltes von Milch und Milchprodukten; Verfahren nach Weibull (Übernahme der gleichnamigen Deutschen Norm DIN 10342, Ausgabe Mai 1987). Ausgabedatum: 1988-5.

**Amtliche Methoden für die Untersuchung von Lebensmitteln**

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (vormals § 35 LMBG), Band I (L), L 00.90-9: Sensorische Prüfverfahren - Bestimmung der Geschmacksempfindlichkeit (Übernahme der gleichnamigen Deutschen Norm DIN 10959, Ausgabe Juli 1998). Ausgabedatum: 1999-11.

**Amtliche Methoden für die Untersuchung von Lebensmitteln**

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (vormals § 35 LMBG), Band I (L), L 15.00-3: Bestimmung des Stickstoffgehaltes und Berechnung des Rohproteingehaltes von Getreide und Hülsenfrüchten; Kjeldahl-Verfahren, (nach DIN EN ISO 20483). Ausgabedatum: 2007-12.

**Amtliche Methoden für die Untersuchung von Lebensmitteln**

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (vormals § 35 LMBG), Band I (L), L 00.90-7: Untersuchung von Lebensmitteln - Sensorische Prüfverfahren - Dreiecksprüfung (Übernahme der gleichnamigen Deutschen Norm DIN EN ISO 4120, Ausgabe Oktober 2007). Ausgabedatum: 2007-12

**Ander P, Marzullo L** (1997) Sugar oxidoreductases and veratryl alcohol oxidase as related to lignin degradation. Low molecular weight compounds in lignin degradation. J Biotechnol 53:115-131.

**Andersen JF, Mikolajczak KL, Reed DK** (1987) Analysis of peach bark volatiles and their electroantennogram activity with lesser peachtree borer *Synanthedon pictipes* (Grote and Robinson). J Chem Ecol 13:2103-2114.

**Aregheore EM** (2002) Chemical evaluation and digestibility of cocoa (*Theobroma cacao*) byproducts fed to goats. Trop Anim Health Prod 34:339-348.

**Aubert C, Ambid C, Baumes R, Gunata Z** (2003) Investigation of bound aroma constituents of yellow-fleshed nectarines (*Prunus persica* L. Cv. Springbright). Changes in bound aroma profile during maturation. J Agric Food Chem 51:6280-6286.

**Baldrian P, Valášková V** (2008) Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. FEMS Microbiol Rev 32:501-521.

**Barreto SM, Lopez MV, Levin L** (2008) Effect of culture parameters on the production of the edible mushroom *Grifola frondosa* (maitake) in tropical weathers. World J Microbiol Biotechnol 24:1361-1366.



**Beck HC, Hansen AM, Lauritsen FR** (2002) Metabolite production and kinetics of branched-chain aldehyde oxidation in *Staphylococcus xylosus*. *Enzyme Microb Technol* 31:94-101.

**Berger RG** (1995) *Aroma biotechnology*. Springer, Berlin [u.a.].

**Berger RG** (2009) Biotechnology of flavours - the next generation. *Biotechnol Lett* 31:1651-1659.

**Berger RG, Krings U, Zorn H** (2010) *Biotechnological Flavour Generation*. In: Taylor AJ, Linforth RST (Hrsg.) *Food flavour technology*, 2. Auflage. Blackwell, Ames, Iowa, S 89-126.

**Bermúdez RC, García N, Gross P, Serrano M** (2001) Cultivation of *Pleurotus* on agricultural substrates in Cuba. *Micol Apl Int* 13:25-29.

**Bhushan S, Kalia K, Sharma M, Singh B, Ahuja PS** (2008) Processing of apple pomace for bioactive molecules. *Crit Rev Biotechnol* 28:285-296.

**Binnig R** (2001) *Die Möglichkeiten der Verwertung von Trestern aus der Fruchtsaft-Herstellung (insbesondere am Beispiel Apfel)*. 2. überarbeitete und erweiterte Auflage. Verband der deutschen Fruchtsaft-Industrie e. V., Trier / Bonn.

**Blandino A, Al-Aseeri ME, Pandiella SS, Cantero D, Webb C** (2003) Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Res Int* 36:527-543.

**Bluemke W, Schrader J** (2001) Integrated bioprocess for enhanced production of natural flavors and fragrances by *Ceratocystis moniliformis*. *Biomol Eng* 17:137-142.

**Botella C, de Ory I, Webb C, Cantero D, Blandino A** (2005) Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. *Engineering bioreaction systems: A Spanish perspective*. *Biochem Eng J* 26:100-106.

**Bouws H, Wattenberg A, Zorn H** (2008) Fungal secretomes—nature's toolbox for white biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 80:381-388.

**Bramorski A, Soccol CR, Christen P, Revah S** (1998) Fruity aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in solid cultures from agro-industrial wastes. *Rev Microbiol* 29:208-212.

- Bravo A, Herrera JC, Scherer E, Ju-Nam Y, Rübsam H, Madrid J, Zufall C, Rangel-Aldao R** (2008) Formation of  $\alpha$ -dicarbonyl compounds in beer during storage of Pilsner. *J Agric Food Chem* 56:4134-4144.
- Breheret S, Talou T, Rapior S, Bessière J** (1997) Monoterpenes in the aromas of fresh wild mushrooms (basidiomycetes). *J Agric Food Chem* 45:831-836.
- Breme K, Langle S, Fernandez X, Meierhenrich UJ, Brevard H, Joulain D** (2009) Character impact odorants from *Brassicaceae* by aroma extract dilution analysis (AEDA): *Brassica cretica* and *Brassica insularis*. *Flavour Frag J* 24:88-93.
- British Mycological Society** (2012) English names for fungi 2012. <http://www.britmycolsoc.org.uk/library/english-names/>. Abgerufen 18. Oktober 2012.
- Brock BJ, Gold MH** (1996) 1,4-Benzoquinone reductase from basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: Spectral and kinetic analysis. *Arch Biochem Biophys* 331:31-40.
- Brock BJ, Rieble S, Gold MH** (1995) Purification and characterization of a 1,4-benzoquinone reductase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 61:3076-3081.
- Buchbauer G, Jirovetz L, Wasicky M, Nikiforov A** (1993) Zum Aroma von Speisepilzen. *Z Lebensm Unters Forsch* 197:429-433.
- Buchin S, Salmom J, Carnat A, Berger T, Bugaud C, Bosset JO** (2002) Identification de composés monoterpéniques, sesquiterpéniques et benzéniques dans un lait d'alpage très riche en ces substances. *Mitt Lebensmittelunters Hyg* 93:199-216.
- Bukvicki D, Gottardi D, Veljic M, Marin PD, Vaninni L, Guerzoni ME** (2012) Identification of volatile components of liverwort (*Porella cordaeana*) extracts using GC/MS-SPME and their antimicrobial activity. *Molecules* 17:6982-6995.
- Buttery RG, Stern DJ, Ling LC** (1994) Studies on flavor volatiles of some sweet corn products. *J Agric Food Chem* 42:791-795.
- Cáceres CX, Cáceres RE, Hein D, Molina MG, Pia JM** (2012) Biogas production from grape pomace: Thermodynamic model of the process and dynamic model of the power generation system (Proceedings of the Symposium on Hydrogen Production and Applications at the 240th American Chemical Society National Meeting, August 22-26, 2010, Boston, Massachusetts, USA). *Int J Hydrogen Energy* 37:10111-10117.

**Campbell-Platt G** (1994) Fermented foods - a world perspective. Food Res Int 27:253-257.

**Cane DE, Salaski EJ, Prabhakaran PC** (1990) Preparation of (-)-aristolochene from (+)-valencene: Absolute configuration of (+)-aristolochene from *Aspergillus terreus*. Tetrahedron Lett 31:1943-1944.

**Cardona JA, Lee J, Talcott ST** (2009) Color and polyphenolic stability in extracts produced from muscadine grape (*Vitis rotundifolia*) pomace. J Agric Food Chem 57:8421-8425.

**Careri M, Corradini C, Elviri L, Nicoletti I, Zagnoni I** (2003) Direct HPLC analysis of quercetin and *trans*-resveratrol in red wine, grape, and winemaking byproducts. J Agric Food Chem 51:5226-5231.

**Carle R, Schieber A** (2006) Gewinnung funktioneller Lebensmittelinhaltsstoffe aus Reststoffen der Karottensaft- und Apfelsaftproduktion. Ernährungsumschau 53:348-352.

**Carrapiso AI, Jurado Á, Timón ML, García C** (2002) Odor-active compounds of Iberian hams with different aroma characteristics. J Agric Food Chem 50:6453-6458.

**Carrau FM, Medina K, Boido E, Farina L, Gaggero C, Dellacassa E, Versini G, Henschke PA** (2005) *De novo* synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. FEMS Microbiol Lett 243:107-115.

**Chaplin MF, Kennedy JF** (1994) Carbohydrate analysis. A practical approach, 2. Auflage. ILR Press, Oxford, New York.

**Chen CC, Kuo MC, Liu SE, Wu CM** (1986) Volatile components of salted and pickled prunes (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.). J Agric Food Chem 34:140-144.

**Chin S, Eyres GT, Marriott PJ** (2011) Identification of potent odourants in wine and brewed coffee using gas chromatography-olfactometry and comprehensive two-dimensional gas chromatography. J Chromatogr A 1218:7487-7498.

**Cho IH, Choi H, Kim Y** (2006) Difference in the volatile composition of pine-mushrooms (*Tricholoma matsutake* Sing.) according to their grades. J Agric Food Chem 54:4820-4825.

**Cho KY** (2007) A method for preparing mushroom beverage. S. Korea. KR2007012589A.

**Choi H** (2003) Character impact odorants of citrus hallabong [(*C. unshiu* Marcov x *C. sinensis* Osbeck) x *C. reticulata* Blanco] cold-pressed peel oil. *J Agric Food Chem* 51:2687-2692.

**Chung TY, Eiserich JP, Shibamoto T** (1993) Volatile compounds isolated from edible Korean *chamchwi* (*Aster scaber* Thunb). *J Agric Food Chem* 41:1693-1697.

**Coghe S, Benoot K, Delvaux F, Vanderhaegen B, Delvaux FR** (2004a) Ferulic acid release and 4-vinylguaiacol formation during brewing and fermentation: Indications for feruloyl esterase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric Food Chem* 52:602-608.

**Coghe S, Martens E, D'Hollander H, Dirinck PJ, Delvaux FR** (2004b) Sensory and instrumental flavour analysis of wort brewed with dark specialty malts. *J Inst Brew* 110:94-103.

**Cohen R, Suzuki MR, Hammel KE** (2004) Differential stress-induced regulation of two quinone reductases in the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. *Appl Environ Microbiol* 70:324-331.

**Comuzzo P, Tat L, Tonizzo A, Battistutta F** (2006) Yeast derivatives (extracts and autolysates) in winemaking: Release of volatile compounds and effects on wine aroma volatility. *Food Chem* 99:217-230.

**Counet C, Callemien D, Ouwerx C, Collin S** (2002) Use of gas chromatography-olfactometry to identify key odorant compounds in dark chocolate. Comparison of samples before and after conching. *J Agric Food Chem* 50:2385-2391.

**Culleré L, Escudero A, Cacho J, Ferreira V** (2004) Gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality spanish aged red wines. *J Agric Food Chem* 52:1653-1660.

**Cutzach I, Chatonnet P, Henry R, Dubourdieu D** (1997) Identification of volatile compounds with a "toasty" aroma in heated oak used in barrellmaking. *J Agric Food Chem* 45:2217-2224.

**Czarra FR** (2009) Spices. A global history. Reaktion Books, London.

**Czerny M, Christlbauer M, Christlbauer M, Fischer A, Granvogl M, Hammer M, Hartl C, Hernandez NM, Schieberle P** (2008) Re-investigation on odour thresholds of key food aroma compounds and development of an aroma language based on odour qualities of defined aqueous odorant solutions. *Eur Food Res Technol* 228:265-273.

**d'Acampora Zellner B, Dugo P, Dugo G, Mondello L** (2008) Gas chromatography-olfactometry in food flavour analysis. *J Chromatogr A* 1186:123-143.

**D'Agostini ÉC, D'Agostini Mantovani TR, do Valle JS, Paccola-Meirelles LD, Colauto NB, Linde GA** (2011) Low carbon/nitrogen ratio increases laccase production from basidiomycetes in solid substrate cultivation. *Sci agric (Piracicaba, Braz.)* 68:295-300.

**de A. Marques F, McElfresh JS, Millar JG** (2000) Kováts retention indexes of monounsaturated C12, C14, and C16 alcohols, acetates and aldehydes commonly found in lepidopteran pheromone blends. *J Braz Chem Soc* 11:592-599.

**De Schutter DP, Saison D, Delvaux F, Derdelinckx G, Rock J, Neven H, Delvaux FR** (2008a) Characterization of volatiles in unhopped wort. *J Agric Food Chem* 56:246-254.

**De Schutter DP, Saison D, Delvaux F, Derdelinckx G, Rock J, Neven H, Delvaux FR** (2008b) Release and evaporation of volatiles during boiling of unhopped wort. *J Agric Food Chem* 56:5172-5180.

**Deki M, Yoshimura M** (1974) Studies on the volatile components of peated malt. III. Identification of acidic and basic components. *Chem Pharm Bull* 22:1760-1764.

**Delahunty CM, Eyres G, Dufour J** (2006) Gas chromatography-olfactometry. *J Sep Sci* 29:2107-2125.

**Deng Q, Penner MH, Zhao Y** (2011) Chemical composition of dietary fiber and polyphenols of five different varieties of wine grape pomace skins. *Food Res Int* 44:2712-2720.

**Deng Q, Zhao Y** (2011) Physicochemical, nutritional, and antimicrobial properties of wine grape (cv. *Merlot*) pomace extract-based films. *J Food Sci* 76:E309.

**Devrajan A, Joshi VK, Gupta K, Sheikher C, Lal BB** (2004) Evaluation of apple pomace based reconstituted feed in rats after solid state fermentation and ethanol recovery. *Braz Arch Biol Technol* 47:93-106.

**Dhillon GS, Brar SK, Verma M, Tyagi RD** (2011) Apple pomace ultrafiltration sludge - A novel substrate for fungal bioproduction of citric acid: Optimisation studies. *Food Chem* 128:864-871.

**Díaz AB, Caro I, Ory I de, Blandino A** (2007) Evaluation of the conditions for the extraction of hydrolitic enzymes obtained by solid state fermentation from grape pomace. *Enzyme Microb Technol* 41:302-306.

**Díaz AB, de Ory I, Caro I, Blandino A** (2012) Enhance hydrolytic enzymes production by *Aspergillus awamori* on supplemented grape pomace. *Food Bioprod Process* 90:72-78.

**Dlusskaya E, Jänsch A, Schwab C, Gänzle M** (2008) Microbial and chemical analysis of a kvass fermentation. *Eur Food Res Technol* 227:261-266.

**Dravnieks A, O'Donnell A** (1971) Principles and some techniques of high-resolution headspace analysis. *J Agric Food Chem* 19:1049-1056.

**Du X, Plotto A, Baldwin E, Rouseff R** (2011) Evaluation of volatiles from two subtropical strawberry cultivars using GC-olfactometry, GC/MS odor activity values, and sensory analysis. *J Agric Food Chem* 59:12569-12577.

**DVAI-Deutscher Verband der Aromenindustrie e. V.** Aromaverzehr in Deutschland. [http://www.aromenhaus.de/fakten/aromaverzehr\\_in\\_deutschland/](http://www.aromenhaus.de/fakten/aromaverzehr_in_deutschland/).  
Abgerufen 24. Juli 2012.

**Elisashvili V, Kachlishvili E, Penninckx M** (2008) Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35:1531-1538.

**El-Sayed AM, Heppelthwaite VJ, Manning LM, Gibb AR, Suckling DM** (2005) Volatile constituents of fermented sugar baits and their attraction to *Lepidopteran* species. *J Agric Food Chem* 53:953-958.

**Engel W, Bahr W, Schieberle P** (1999) Solvent assisted flavour evaporation - A new and versatile technique for the careful and direct isolation of aroma compounds from complex food matrices. *Eur Food Res Technol* 209:237-241.

**Escudero A, Campo E, Farina L, Cacho J, Ferreira V** (2007) Analytical characterization of the aroma of five premium red wines. Insights into the role of odor families and the concept of fruitiness of wines. *J Agric Food Chem* 55:4501-4510.

**Europäisches Parlament und Rat (2008)** Verordnung (EG) Nr. 1334/2008 des Europäischen Parlaments und Rates vom 16. Dezember 2008 über Aromen und bestimmte Lebensmittelzutaten mit Aromaeigenschaften zur Verwendung in und auf Lebensmitteln sowie zur Änderung der Verordnung (EWG) Nr. 1601/91 des Rates, der Verordnungen (EG) Nr. 2232/96 und (EG) Nr. 110/2008 und der Richtlinie 2000/13/EG. Amtsblatt der EU ABI. L 354 vom 31.12.2008.

**Falcão LD, de Revel G, Rosier JP, Bordignon-Luiz MT (2008)** Aroma impact components of Brazilian Cabernet Sauvignon wines using detection frequency analysis (GC-olfactometry). Food Chem 107:497-505.

**Fan L, Pandey A, Mohan R, Soccol CR (2000)** Use of various coffee industry residues for the cultivation of *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation. Phytochemistry 20:41-52.

**Fang Y, Qian M (2005)** Aroma compounds in Oregon *Pinot Noir* wine determined by aroma extract dilution analysis (AEDA). Flavour Frag J 20:22-29.

**Favela-Torres E, Volke-Sepulveda T, Viniegra-Gonzalez G (2006)** Production of hydrolytic depolymerising pectinases. Food Technol Biotechnol 44:221-227.

**Fernandez X, Lizzani-Cuvelier L, Loiseau A, Perichet C, Delbecq C, Arnaudo J (2005)** Chemical composition of the essential oils from Turkish and Honduras *Styrax*. Flavour Frag J 20:70-73.

**Ferreira P, Hernández-Ortega A, Herguedas B, Rencoret J, Gutiérrez A, Martínez MJ, Jiménez-Barbero J, Medina M, Martínez ÁT (2010)** Kinetic and chemical characterization of aldehyde oxidation by fungal aryl-alcohol oxidase. Biochem J 425:585-593.

**Ferreira V, Aznar M, López R, Cacho J (2001)** Quantitative gas chromatography-olfactometry carried out at different dilutions of an extract. Key differences in the odor profiles of four high-quality spanish aged red wines. J Agric Food Chem 49:4818-4824.

**Figuerola F, Hurtado ML, Estévez AM, Chiffelle I, Asenjo F (2005)** Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fibre sources for food enrichment. Food Chem 91:395-401.

**Flach A, Dondon R, Singer R, Koehler S, Amaral M, Marsaioli A (2004)** The chemistry of pollination in selected brazilian *Maxillariinae* orchids: Floral rewards and fragrance. J Chem Ecol 30:1045-1056.

**Food and Agriculture Organization** (2012a) FAOSTAT-Area Harvested (Ha). FAO statistical databases.

<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>.

Abgerufen 18. Juli 2012.

**Food and Agriculture Organization** (2012b) FAOSTAT-Production (tonnes) apples. FAO statistical databases.

<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>.

Abgerufen 18. Juli 2012.

**Fraatz MA, Riemer SJL, Stöber R, Kaspera R, Nimtz M, Berger RG, Zorn H** (2009) A novel oxygenase from *Pleurotus sapidus* transforms valencene to nootkatone. J Mol Catal B Enzym 61:202-207.

**Fraatz MA, Zorn H** (2010) Fungal Flavours. Industrial Applications. In: Hofrichter M (Hrsg.) Industrial applications, 2. Auflage. Springer, Berlin Heidelberg, S 249–268.

**Fritsch HT, Schieberle P** (2005) Identification based on quantitative measurements and aroma recombination of the character impact odorants in a Bavarian Pilsner-type beer. J Agric Food Chem 53:7544-7551.

**Fu S, Yoon Y, Bazemore R** (2001) Aroma-active components in fermented bamboo shoots. J Agric Food Chem 50:549-554.

**Fuhrmann E, Grosch W** (2002) Character impact odorants of the apple cultivars Elstar and Cox Orange. Nahrung 46:187-193.

**Fukami K, Ishiyama S, Yaguramaki H, Masuzawa T, Nabeta Y, Endo K, Shimoda M** (2002) Identification of distinctive volatile compounds in fish sauce. J Agric Food Chem 50:5412-5416.

**Fuller GH, Steltenkamp R, Tisserand GA** (1964) The gas chromatograph with human sensor: Perfumer model. Ann NY Acad Sci 116:711-724.

**Gallois A, Gross B, Langlois D, Spinnler H, Brunerie P** (1990) Influence of culture conditions on production of flavour compounds by 29 ligninolytic basidiomycetes. Mycol Res 94:494-504.

**Gijs L, Chevance F, Jerkovic V, Collin S** (2002) How low pH can intensify  $\beta$ -damascenone and dimethyl trisulfide production through beer aging. J Agric Food Chem 50:5612-5616.



**Giri A, Osako K, Okamoto A, Ohshima T** (2010) Olfactometric characterization of aroma active compounds in fermented fish paste in comparison with fish sauce, fermented soy paste and sauce products. *Food Res Int* 43:1027-1040.

**Goni I, Brenes A, Centeno C, Viveros A, Saura-Calixto F, Rebole A, Arija I, Estevez R** (2007) Effect of dietary grape pomace and vitamin E on growth performance, nutrient digestibility, and susceptibility to meat lipid oxidation in chickens. *Poult Sci* 86:508-516.

**Goswami V, Srivastava AK** (2000) Fed-batch propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici*. *Biochem Eng J* 4:121-128.

**Grigelmo-Miguel N, Martín-Belloso O** (1999) Comparison of dietary fibre from by-products of processing fruits and greens and from cereals. *LWT-Food Sci Technol* 32:503-508.

**Grosch W** (1990) Analyse von Aromastoffen. *Chem unserer Zeit* 24:82-89.

**Grosch W** (1994) Determination of potent odourants in foods by aroma extract dilution analysis (AEDA) and calculation of odour activity values (OAVs). *Flavour Frag J* 9:147-158.

**Guedes C, Pinto A, Moreira R, de Maria C** (2004) Study of the aroma compounds of rose apple (*Syzygium jambos* Alston) fruit from Brazil. *Eur Food Res Technol* 219:460-464.

**Gueguen Y, Chemardin P, Pien S, Arnaud A, Galzy P** (1997) Enhancement of aromatic quality of Muscat wine by the use of immobilized  $\beta$ -glucosidase. *J Biotechnol* 55:151-156.

**Guentert M** (2007) The flavour and fragrance industry - Past, present, and future. In: Berger RG (Hrsg.) *Flavours and fragrances. Chemistry, bioprocessing and sustainability*. Springer, Berlin, New York, S 1–14.

**Gullón B, Yáñez R, Alonso JL, Parajó JC** (2008) L-Lactic acid production from apple pomace by sequential hydrolysis and fermentation. *Bioresour Technol* 99:308-319.

**Gunata YZ, Bayonove CL, Baumes RL, Cordonnier RE** (1985) The aroma of grapes I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. *J Chromatogr A* 331:83-90.

**Guth H** (1997) Identification of character impact odorants of different white wine varieties. *J Agric Food Chem* 45:3022-3026.

- Hage A, Schoemaker HE, Field JA** (1999) Reduction of aryl acids by white-rot fungi for the biocatalytic production of aryl aldehydes and alcohols. *Appl Microbiol Biotechnol* 52:834-838.
- Hanaoka K, Sieffermann J, Giampaoli P** (2000) Effects of the sniffing port air makeup in gas chromatography-olfactometry. *J Agric Food Chem* 48:2368-2371.
- Hanaoka K, Vallet N, Giampaoli P, Heyd B, MacLeod P** (2001) Possible influence of breathing on detection frequency and intensity rating in gas chromatography-olfactometry. *Food Chem* 72:97-103.
- Hanssen H, Abraham W** (1987) Odoriferous compounds from liquid cultures of *Gloeophyllum odoratum* and *Lentinellus cochleatus* (basidiomycotina). *Flavour Frag J* 2:171-174.
- Hauck T, Bruhlmann F, Schwab W** (2003) Formation of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3[2H]-furanone by *Zygosaccharomyces rouxii*: Identification of an intermediate. *Appl Environ Microbiol* 69:3911-3918.
- Hayashida Y, Slaughter J** (1997) Biosynthesis of flavour-active furanones by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation depends on the malt type used in medium preparation. *Biotechnol Lett* 19:429-431.
- Himmi EH, Bories A, Boussaid A, Hassani L** (2000) Propionic acid fermentation of glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici* and *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 53:435-440.
- Ho C, Aida WW, Maskat M, Osman H** (2007) Changes in volatile compounds of palm sap (*Arenga pinnata*) during the heating process for production of palm sugar. *Food Chem* 102:1156-1162.
- Hoff S, Lund MN, Petersen MA, Jespersen BM, Andersen ML** (2012) Influence of malt roasting on the oxidative stability of sweet wort. *J Agric Food Chem* 60:5652-5659.
- Högnadóttir Á, Rouseff RL** (2003) Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography-olfactometry and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 998:201-211.
- Huelin FE, Murray KE** (1966)  $\alpha$ -Farnesene in the natural coating of apples. *Nature* 210:1260-1261.

**Janáčová A, Sádecká J, Kohajdová Z, Špánik I** (2008) The identification of aroma-active compounds in Slovak brandies using GC-sniffing, GC–MS and sensory evaluation. *Chroma* 67:113-121.

**Janssens L, De Pooter HL, Schamp NM, Vandamme EJ** (1992) Production of flavours by microorganisms. *Process Biochem* 27:195-215.

**Jensen KA, Ryan ZC, Vanden Wymelenberg A, Cullen D, Hammel KE** (2002) An NADH:quinone oxidoreductase active during biodegradation by the brown-rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. *Appl Environ Microbiol* 68:2699-2703.

**Jin Z, Yang S** (1998) Extractive fermentation for enhanced propionic acid production from lactose by *Propionibacterium acidipropionici*. *Biotechnol Progress* 14:457-465.

**Jonathan SG, Fasidi IO** (2001) Studies on phytohormones, vitamins and mineral element requirements of *Lentinus subnudus* (Berk) and *Schizophyllum commune* (Fr. Ex. Fr) from Nigeria. *Food Chem* 75:303-307.

**Jong E de, Field JA, Spinnler HE, Wijnberg JB, Bont JA de** (1994) Significant biogenesis of chlorinated aromatics by fungi in natural environments. *Appl Environ Microbiol* 60:264-270.

**Jordán MJ, Goodner KL, Shaw PE** (2002a) Characterization of the aromatic profile in aqueous essence and fruit juice of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims F. *Flavicarpa degner*) by GC–MS and GC/O. *J Agric Food Chem* 50:1523-1528.

**Jordán MJ, Margaría CA, Shaw PE, Goodner KL** (2002b) Aroma active components in aqueous kiwi fruit essence and kiwi fruit puree by GC/MS and multidimensional GC/GC-O. *J Agric Food Chem* 50:5386-5390.

**Jordan MJ, Margaría CA, Shaw PE, Goodner KL** (2003) Volatile components and aroma active compounds in aqueous essence and fresh pink guava fruit puree (*Psidium guajava* L.) by GC/MS and multidimensional GC/GC-O. *J Agric Food Chem* 51:1421-1426.

**Kachlishvili E, Penninckx M, Tsiklauri N, Elisashvili V** (2006) Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation. *World J Microbiol Biotechnol* 22:391-397.

**Kahlos K, Kiviranta JLJ, Hiltunen RVK** (1994) Volatile constituents of wild and in vitro cultivated *Gloeophyllum odoratum*. *Phytochemistry* 36:917-922.

**Kamada F, Abe S, Hiratsuka N, Wariishi H, Tanaka H** (2002) Mineralization of aromatic compounds by brown-rot basidiomycetes - Mechanisms involved in initial attack on the aromatic ring. *Microbiology* 148:1939-1946.

**Kammerer D, Claus A, Carle R, Schieber A** (2004) Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *J Agric Food Chem* 52:4360-4367.

**Karlsson HOE, Trägårdh G** (1994) Aroma compound recovery with pervaporation - the effect of high ethanol concentrations. *J Memb Sci* 91:189-198.

**Karlsson MF, Birgersson G, Cotes Prado AM, Bosa F, Bengtsson M, Witzgall P** (2009) Plant odor analysis of potato: Response of guatemalan moth to above- and belowground potato volatiles. *J Agric Food Chem* 57:5903-5909.

**Kawabe T, Morita H** (1994) Production of benzaldehyde and benzyl alcohol by the mushroom *Polyporus tuberaster* K2606. *Biotechnol Lett* 42:2556-2560.

**Kawasaki W, Matsui K, Akakabe Y, Itai N, Kajiwar T** (1998) Long-chain aldehyde-forming activity in tobacco leaves. *Phytochemistry* 49:1565-1568.

**Kaya A, Başer KHC, Demirci B, Koca F** (1999) The essential oil of *Acinos alpinus* (L.) Moench growing in Turkey. *Flavour Frag J* 14:55-59.

**Kim MR, El-Aty AMA, Kim IS, Shim JH** (2006) Determination of volatile flavor components in danggui cultivars by solvent free injection and hydrodistillation followed by gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *J Chromatogr A* 1116:259-264.

**King A, Dickinson JR** (2000) Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 16:499-506.

**Kirk PM, Ainsworth GC** (2008) Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi, 10. Auflage. CAB Internat, Wallingford.

**Kirk TK** (1971) Effects of microorganisms on lignin. *Annu Rev Phytopathol* 9:185-210.

**Kirk TK, Croan S, Tien M, Murtagh KE, Farrell RL** (1986) Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. *Enzyme Microb Technol* 8:27-32.

**Kirk TK, Farrell RL** (1987) Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin. *Annu Rev Microbiol* 41:465-505.

**Komes D, Ulrich D, Lovric T** (2006) Characterization of odor-active compounds in Croatian Rhine Riesling wine, subregion Zagorje. *Eur Food Res Technol* 222:1-7.

**Körtvélyesi T, Görgényi M, Héberger K** (2001) Correlation between retention indices and quantum-chemical descriptors of ketones and aldehydes on stationary phases of different polarity. *Anal Chim Acta* 428:73-82.

**Kováts E** (1958) Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. *Helv Chim Acta* 41:1915-1932.

**Kowalsky P, Blum W, Weber T** (2011) Produkt- und Markendifferenzierung als Ausdruck einer Unternehmensphilosophie. In: Völckner F, Willers C, Weber T (Hrsg.) *Markendifferenzierung. Innovative Konzepte zur erfolgreichen Markenprofilierung*. Gabler, Wiesbaden, S 245-258.

**Kraujalyte V, Leitner E, Venskutonis PR** (2012) Chemical and sensory characterisation of aroma of *Viburnum opulus* fruits by solid phase microextraction-gas chromatography-olfactometry. *Food Chem* 132:717-723.

**Krings U, Abraham BG, Berger RG** (1995) Plant impact volatiles from higher fungi: A biotechnological perspective. *Perfum Flavor* 20:79-86.

**Krings U, Berger RG** (1998) Biotechnological production of flavours and fragrances. *Appl Microbiol Biotechnol* 49:1-8.

**Krings U, Grimrath A, Linke D, Schindler S, Berger RG** (2011) Volatiles responsible for the seasoning-like flavour of cell cultures of *Laetiporus sulphureus*. *Flavour Frag J* 26:174-179.

**Krings U, Hinz M, Berger RG** (1996) Degradation of [ $^2\text{H}$ ]phenylalanine by the basidiomycete *Ischnoderma benzoinum*. *Crit Rev Food Sci Nutr* 51:123-129.

**Krings U, Pilawa S, Theobald C, Berger RG** (2001) Phenyl propenoic side chain degradation of ferulic acid by *Pycnoporus cinnabarinus* - Elucidation of metabolic pathways using [5- $^2\text{H}$ ]-ferulic acid. *J Biotechnol* 85:305-314.

**Krings U, Zelena K, Wu S, Berger RG** (2006) Thin-layer high-vacuum distillation to isolate volatile flavour compounds of cocoa powder. *Eur Food Res Technol* 223:675-681.

- Krist S, Stuebiger G, Unterweger H, Bandion F, Buchbauer G** (2005) Analysis of volatile compounds and triglycerides of seed oils extracted from different poppy varieties (*Papaver somniferum* L.). J Agric Food Chem 53:8310-8316.
- Lamer T, Spinnler HE, Souchon I, Voilley A** (1996) Extraction of benzaldehyde from fermentation broth by pervaporation. Process Biochem 31:533-542.
- Lapadatescu C, Feron G, Vergoignan C, Djian A, Durand A, Bonnarme P** (1997) Influence of cell immobilization on the production of benzaldehyde and benzyl alcohol by the white-rot fungi *Bjerkandera adusta*, *Ischnoderma benzoinum* and *Dichomitus squalens*. Appl Environ Microbiol 47:708-714.
- Lapadatescu C, Giniès C, Le Quéré JL, Bonnarme P** (2000) Novel scheme for biosynthesis of aryl metabolites from L-phenylalanine in the fungus *Bjerkandera adusta*. Appl Environ Microbiol 66:1517-1522.
- Lavelli V, Corti S** (2011) Phloridzin and other phytochemicals in apple pomace: Stability evaluation upon dehydration and storage of dried product. Food Chem 129:1578-1583.
- Le Guen S, Prost C, Demaimay M** (2000) Characterization of odorant compounds of mussels (*Mytilus edulis*) according to their origin using gas chromatography-olfactometry and gas chromatography-mass spectrometry. 6th Int. Symp. on Hyphenated Techniques in Chromatography. J Chromatogr A 896:361-371.
- Lee G-H, Shin Y, Oh M-J** (2008) Aroma-active components of lycii fructus (*kukija*). J Food Sci 73:C500-C505.
- Lee S, Moon D, Choi HT, Song H** (2007) Purification and characterization of an intracellular NADH: quinone reductase from *Trametes versicolor*. J Microbiol 45:333-338.
- Lee S, Noble AC** (2003) Characterization of odor-active compounds in Californian Chardonnay wines using GC-olfactometry and GC-mass spectrometry. J Agric Food Chem 51:8036-8044.
- Lee S, Umano K, Shibamoto T, Lee K** (2005) Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. Food Chem 91:131-137.
- Leffingwell & Associates** (2012) Flavor & Fragrance Industry - Top 10. [http://www.leffingwell.com/top\\_10.htm](http://www.leffingwell.com/top_10.htm). Abgerufen 24. Juli 2012.

**Leffingwell JC, Alford ED** (2005) Volatile constituents of perique tobacco. *J Environ Agric Food Chem* 4:899-915.

**Li T, Rosazza JPN** (1997) Purification, characterization, and properties of an aryl aldehyde oxidoreductase from *Nocardia* sp. strain NRRL 5646. *J Bacteriol* 179:3482-3487.

**Li T, Rosazza JPN** (2000) The carboxylic acid reduction pathway in *Nocardia*. Purification and characterization of the aldehyde reductase. *J Ind Microbiol Biotechnol* 25:328-332.

**Lilly M, Bauer FF, Styger G, Lambrechts MG, Pretorius IS** (2006) The effect of increased branched-chain amino acid transaminase activity in yeast on the production of higher alcohols and on the flavour profiles of wine and distillates. *FEMS Yeast Res* 6:726-743.

**Lin E, Sung S** (2006) Cultivating conditions influence exopolysaccharide production by the edible basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. *Int J Food Microbiol* 108:182-187.

**Lomascolo A, Asther M, Navarro D, Antona C, Delattre M, Lesage-Meessen L** (2001) Shifting the biotransformation pathways of L-phenylalanine into benzaldehyde by *Trametes suaveolens* CBS 334.85 using HP20 resin. *Lett Appl Microbiol* 32:262-267.

**Lomascolo A, Lesage-Meessen L, Labat M, Navarro D, Delattre M, Asther M** (1999) Enhanced benzaldehyde formation by a monokaryotic strain of *Pycnoporus cinnabarinus* using a selective solid adsorbent in the culture medium. *Can J Microbiol* 45:653-657.

**Lu C, Hao Z, Payne R, Ho C** (2005) Effects of water content on volatile generation and peptide degradation in the Maillard reaction of glycine, diglycine, and triglycine. *J Agric Food Chem* 53:6443-6447.

**Machiels D, van Ruth SM, Posthumus MA, Istasse L** (2003) Gas chromatography-olfactometry analysis of the volatile compounds of two commercial Irish beef meats. *Talanta* 60:755-764.

**Machuca A, Ferraz A** (2001) Hydrolytic and oxidative enzymes produced by white- and brown-rot fungi during *Eucalyptus grandis* decay in solid medium. *Enzyme Microb Technol* 29:386-391.

**Mackie AE, Slaughter JC** (2002) Formation of 4-hydroxyfuranones and their precursors during production of worts and beers. *J Inst Brew* 108:336-343.

- Madrera RR, Valles BS** (2011) Determination of volatile compounds in apple pomace by stir bar sorptive extraction and gas chromatography-mass spectrometry (SBSE-GC/MS). *J Food Sci* 76:C1326-C1334.
- Mayorga H, Knapp H, Winterhalter P, Duque C** (2001) Glycosidically bound flavor compounds of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). *J Agric Food Chem* 49:1904-1908.
- Mayr P, Petschacher B, Nidetzky B** (2003) Xylose reductase from the Basidiomycete fungus *Cryptococcus flavus*: Purification, steady-state kinetic characterization, and detailed analysis of the substrate binding pocket using structure-activity relationships. *J Biochem* 133:553-562.
- Medeiros ABP, Pandey A, Freitas RJS, Christen P, Soccol CR** (2000) Optimization of the production of aroma compounds by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation using factorial design and response surface methodology. *Biochem Eng J* 6:33-39.
- Meigh DF, Filmer AAE** (1969) Natural skin coating of the apple and its influence on scald in storage III.  $\alpha$ -farnesene. *J Sci Food Agric* 20:139-143.
- Mo H, Zhu Y, Chen Z** (2008) Microbial fermented tea - A potential source of natural food preservatives. *Trends Food Sci Technol* 19:124-130.
- Morteza-Semnani K, Saeedi M** (2005) The essential oil composition of *Phlomis bruguieri* Desf. from Iran. *Flavour Frag J* 20:344-346.
- Mussatto SI, Ballesteros LF, Martins S, Teixeira JA** (2011) Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Sep Purif Technol* 83:173-179.
- Nakae T, Elliott JA** (1965) Production of volatile fatty acids by some lactic acid bacteria. II. Selective formation of volatile fatty acids by degradation of amino acids. *J Dairy Sci* 48:293-299.
- Ngadi MO, Correia LR** (1992a) Solid state ethanol fermentation of apple pomace as affected by moisture and bioreactor mixing speed. *J Food Science* 57:667-670.
- Ngadi MO, Correia LR** (1992b) Kinetics of solid-state ethanol fermentation from apple pomace. *J Food Eng* 17:97-116.
- Nimura Y, Tsujiyama S, Ueno M** (2010) Bioconversion of cinnamic acid derivatives by *Schizophyllum commune*. *J Gen Appl Microbiol* 56:381-387.



**Ong PKC, Acree TE** (1999) Similarities in the aroma chemistry of Gewürztraminer variety wines and lychee (*Litchi chinesis* Sonn.) fruit. J Agric Food Chem 47:665-670.

**Ong PKC, Acree TE, Lavin EH** (1998) Characterization of volatiles in rambutan fruit (*Nephelium lappaceum* L.). J Agric Food Chem 46:611-615.

**Osorio C, Alarcon M, Moreno C, Bonilla A, Barrios J, Garzon C, Duque C** (2006) Characterization of odor-active volatiles in champa (*Campomanesia lineatifolia* R. & P.). J Agric Food Chem 54:509-516.

**Osugi T, Okamura T** (2001) Basidiomycete for manufacture of alcoholic beverage. Mukogawa Gakuin University, Japan. JP2001286276A.

**Pérez J, Muñoz-Dorado J, de La Rubia T, Martínez J** (2002) Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: An overview. Int Microbiol 5:53-63.

**Pettipher G** (1987) Cultivation of the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on lignocellulosic waste. J Agric Food Chem 41:259-265.

**Pham AJ, Schilling MW, Yoon Y, Kamadia VV, Marshall DL** (2008) Characterization of fish sauce aroma-impact compounds using GC/MS, SPME-Osme-GCO, and Stevens' Power Law exponents. J Food Sci 73:C268-C274.

**Pinelo M, Tress AG, Pedersen M, Aand A, Meyer AS** (2007) Effect of cellulases, solvent type and particle size distribution on the extraction of chlorogenic acid and other phenols from spent coffee grounds. Am J Food Technol 7:641-651.

**Ping L, Pizzi A, Guo ZD, Brosse N** (2011) Condensed tannins extraction from grape pomace: Characterization and utilization as wood adhesives for wood particleboard. Ind Crops Prod 34:907-914.

**Pino JA, Marbot R** (2001) Volatile flavor constituents of acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. J Agric Food Chem 49:5880-5882.

**Pino JA, Mesa J, Munoz Y, Marti MP, Marbot R** (2005) Volatile components from mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. J Agric Food Chem 53:2213-2223.

**Piovano M, Garbarino JA, Sanchez E, Young ME** (2009) Volatile organic components from fresh non-edible basidiomycetes fungi. Nat Prod Commun 4:1737-1739.

**Plutowska B, Wardencki W** (2008) Application of gas chromatography-olfactometry (GC-O) in analysis and quality assessment of alcoholic beverages – A review. *Food Chem* 107:449-463.

**Prado FC, Parada JL, Pandey A, Soccol CR** (2008) Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Res Int* 41:111-123.

**Qi W, Jellison J** (2004) Induction and catalytic properties of an intracellular NADH-dependent 1,4-benzoquinone reductase from the brown-rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. *Int Biodeterior Biodegradation* 54:53-60.

**Rapior S, Breheret S, Talou T, Pélissier Y, Bessière J** (2002) The anise-like odor of *Clitocybe odora*, *Lentinellus cochleatus* and *Agaricus essettei*. *Mycologia* 94:373-376.

**Rega B, Guerard A, Delarue J, Maire M, Giampaoli P** (2009) On-line dynamic HS-SPME for monitoring endogenous aroma compounds released during the baking of a model cake. *Food Chem* 112:9-17.

**Rieble S, Joshi DK, Gold MH** (1994) Aromatic nitroreductase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem Biophys Res Commun* 205:298-304.

**Ristoiu D, Kovacs E, Parvu M, Silaghi-Dumitrescu L** (2009) Chemical contents identification on GC/MS from selected species of *Macromycetes*. *Stud Univ Babes-Bolyai, Chem* 54:63-66.

**Rodríguez LA, Toro ME, Vazquez F, Correa-Daneri ML, Gouiric SC, Vallejo MD** (2010) Bioethanol production from grape and sugar beet pomaces by solid-state fermentation. 3rd Argentinean and 2nd Latin American Congress in Hydrogen and Sustainable Energy Sources. *Int J Hydrogen Energy* 35:5914-5917.

**Roscher R, Hilkert A, Gessner M, Schindler E, Schreier P, Schwab W** (1997) L-Rhamnose: Progenitor of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3 [2H]-furanone formation by *Pichia capsulata*? *Z Lebensm Unters Forsch* 204:198-201.

**Rösecke J, König WA** (2000) Odorous compounds from the fungus *Gloeophyllum odoratum*. *Flavour Frag J* 15:315-319.

**Rösecke J, Pietsch M, König WA** (2000) Volatile constituents of wood-rotting basidiomycetes. *Phytochemistry* 54:747-750.

**Rusjan D, Strlič M, Košmerl T, Prosen H** (2009) The response of monoterpenes to different enzyme preparations in Gewürztraminer (*Vitis vinifera* L.) wines. *S Afr J Enol Vitic* 30:56-64.

**Rychlik M, Schieberle P, Grosch W** (1998) Compilation of odor thresholds, odor qualities and retention indices of key food odorants. Dt. Forschungsanst. für Lebensmittelchemie; Inst. für Lebensmittelchemie, Garching, Deutschland.

**Sanchez A, Ysunza F, Beltran-Garcia MJ, Esqueda M** (2002) Biodegradation of viticulture wastes by *Pleurotus*: A source of microbial and human food and its potential use in animal feeding. *J Agric Food Chem* 50:2537-2542.

**San-Juan F, Pet'ka J, Cacho J, Ferreira V, Escudero A** (2010) Producing headspace extracts for the gas chromatography-olfactometric evaluation of wine aroma. *Food Chem* 123:188-195.

**Schieber A, Carle R** (2001) By-products of plant food processing as a source of functional compounds - Recent developments. *Trends Food Sci Technol* 12:401-413.

**Schieberle P** (1992) Formation of Furaneol in Heat-Processed Foods. In: Teranishi R, Takeoka GR, Güntert M (Hrsg.) *Flavor precursors*. American Chemical Society, Washington, S 164-174.

**Schieberle P** (2005) The carbon module labeling (CAMOLA) technique: A useful tool for identifying transient intermediates in the formation of Maillard-type target molecules. *Ann NY Acad Sci* 1043:236-248.

**Schieberle P, Molyneux RJ** (2012) Quantitation of sensory-active and bioactive constituents of food: A *Journal of Agricultural and Food Chemistry* perspective. *J Agric Food Chem* 60:2404-2408.

**Schnermann P, Schieberle P** (1997) Evaluation of key odorants in milk chocolate and cocoa mass by aroma extract dilution analyses. *J Agric Food Chem* 45:867-872.

**Schrader J** (2007) Microbial flavour production. In: Berger RG (Hrsg.) *Flavours and fragrances*. Springer Berlin Heidelberg, S 507-574.

**Schrader J, Etschmann M, Sell D, Hilmer J, Rabenhorst J** (2004) Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavour compounds - Current industrial processes and future prospects. *Biotechnol Lett* 26:463-472.

**Schulbach K, Rouseff R, Sims C** (2004) Relating descriptive sensory analysis to gas chromatography/olfactometry ratings of fresh strawberries using partial least squares regression. *J Food Science* 69:273-277.

**Serra Bonvehí J, Ventura Coll F** (2002) Factors affecting the formation of alkylpyrazines during roasting treatment in natural and alkalinized cocoa powder. *J Agric Food Chem* 50:3743-3750.

**Serra Bonvehí S** (2005) Investigation of aromatic compounds in roasted cocoa powder. *Eur Food Res Technol* 221:19-29.

**Setzer WN, Noletto JA, Lawton RO** (2006) Chemical composition of the floral essential oil of *Randia matudae* from Monteverde, Costa Rica. *Flavour Frag J* 21:244-246.

**Shams-Ardakani M, Ghannadi A, Badr P, Mohagheghzadeh A** (2005) Biotransformation of terpenes and related compounds by suspension culture of *Glycyrrhiza glabra* L. (*Papilionaceae*). *Flavour Frag J* 20:141-144.

**She M, Hwang S** (2006) Recovery of key components from real flavor concentrates by pervaporation. *J Memb Sci* 279:86-93.

**Shi S** (2010) A beverage containing *Pleurotus citrinipileatus* Sing and its preparative method. Yanbian University, Peop. Rep. China. CN101703296A.

**Shih I, Chou B, Chen C, Wu J, Hsieh C** (2008) Study of mycelial growth and bioactive polysaccharide production in batch and fed-batch culture of *Grifola frondosa*. *Bioresour Technol* 99:785-793.

**Shojaosadati SA, Babaeipour V** (2002) Citric acid production from apple pomace in multi-layer packed bed solid-state bioreactor. *Process Biochem* 37:909-914.

**Shutova V, Revin V, Myakushina Y** (2008) The effect of copper ions on the production of laccase by the fungus *Lentinus (Panus) tigrinus*. *Appl Biochem Biotechnol* 44:619-623.

**Silk PJ, Aubry C, Lonergan GC, Macaulay JB** (2001) Chlorometabolite production by the ecologically important white rot fungus *Bjerkandera adusta*. *Chemosphere* 44:1603-1616.

**Silva ML, Malcata FX** (1998) Relationships between storage conditions of grape pomace and volatile composition of spirits obtained therefrom. *Am J Enol Vitic* 49:56-64.

**Sprecher E** (1959) Über die Guttation bei Pilzen. *Planta* 53:565-574.

**Steinhaus M, Schieberle P** (2000) Comparison of the most odor-active compounds in fresh and dried hop cones (*Humulus lupulus* L. Variety Spalter Select) based on GC-olfactometry and odor dilution techniques. *J Agric Food Chem* 48:1776-1783.

**Steinkraus KH** (2009) Fermented Foods. In: Schaechter M (Hrsg) Encyclopedia of microbiology, 3. Auflage. Academic Press; Elsevier, Oxford, S 45-53.

**Stentelaire C, Lesage-Meessen L, Oddou J, Bernard O, Bastin G, Ceccaldi BC, Asther M** (2000) Design of a fungal bioprocess for vanillin production from vanillic acid at scalable level by *Pycnoporus cinnabarinus*. *J Biosci Bioeng* 89:223-230.

**Stredansky M, Conti E** (1999) Xanthan production by solid state fermentation. *Process Biochem* 34:581-587.

**Sudha ML, Baskaran V, Leelavathi K** (2007) Apple pomace as a source of dietary fiber and polyphenols and its effect on the rheological characteristics and cake making. *Food Chem* 104:686-692.

**Sun SY, Jiang WG, Zhao YP** (2010) Characterization of the aroma-active compounds in five sweet cherry cultivars grown in Yantai (China). *Flavour Frag J* 25:206-213.

**Švitel J, Šturdík E** (1995) n-Propanol conversion to propionic acid by *Gluconobacter oxydans*. *Enzyme Microb Technol* 17:546-550.

**Takeoka G, Perrino C, Buttery R** (1996) Volatile constituents of used frying oils. *J Agric Food Chem* 44:654-660.

**Takizawa R, Watari J, Kawamura A** (2005) Production method of alcoholic beverage by using Basidiomycota. Sapporo Breweries Ltd., Japan. JP2005210939A.

**Tang Y, Zhu L** (2007) Submerged culture of mushrooms in bioreactors - Challenges, current state-of-the-art, and future prospects. *Food Technol Biotechnol* 45:221-229.

**Taubert J, Krings U, Berger RG** (2000) A comparative study on the disintegration of filamentous fungi. *J Microbiol Methods* 42:225-232.

**Tellez MR, Canel C, Rimando AM, Duke SO** (1999) Differential accumulation of isoprenoids in glanded and glandless *Artemisia annua* L. *Phytochemistry* 52:1035-1040.

**Tiefel P, Berger RG** (1993) Volatiles in precursor fed cultures of basidiomycetes. In: Schreier P, Winterhalter P (Hrsg.) Progress in flavour precursor studies. Analysis generation biotechnology: International conference: Papers. Allured, Carol Stream, IL, S 439–450.

**Tokitomo Y, Steinhaus M, Büttner A, Schieberle P** (2005) Odor-active constituents in fresh pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.) by quantitative and sensory evaluation. Biosci Biotechnol Biochem 69:1323-1330.

**Tressl R, Bahri D, Engel KH** (1982) Formation of eight-carbon and ten-carbon components in mushrooms (*Agaricus campestris*). J Agric Food Chem 30:89-93.

**Tsai S, Huang S, Lo S, Wu T, Lian P, Mau J** (2009) Flavour components and antioxidant properties of several cultivated mushrooms. Food Chem 113:578-584.

**Tsuji H, Mizuno A** (2010) Volatile compounds and the changes in their concentration levels during storage in beers containing varying malt concentrations. J Food Science 75:C79-C84.

**Ubeda C, San-Juan F, Concejero B, Callejón RM, Troncoso AM, Morales ML, Ferreira V, Hernández-Orte P** (2012) Glycosidically bound aroma compounds and impact odorants of four strawberry varieties. J Agric Food Chem 60:6095-6102.

**Valim MF, Rouseff RL, Lin J** (2003) Gas chromatographic-olfactometric characterization of aroma compounds in two types of cashew apple nectar. J Agric Food Chem 51:1010-1015.

**van den Ban ECD, Willemsen HM, Wassink H, Laane C, Haaker H** (1999) Bioreduction of carboxylic acids by *Pyrococcus furiosus* in batch cultures. Enzyme Microb Technol 25:251-257.

**Vane LM** (2005) A review of pervaporation for product recovery from biomass fermentation processes. J Chem Technol Biotechnol 80:603-629.

**Varming C, Petersen MA, Poll L** (2004) Comparison of isolation methods for the determination of important aroma compounds in black currant (*Ribes nigrum* L.) juice, using nasal impact frequency profiling. J Agric Food Chem 52:1647-1652.

**VDF Verband der deutschen Fruchtsaftindustrie** (2012a) Entwicklung des Pro-Kopf-Verbrauchs an Fruchtsäften/Fruchtnektaren in Deutschland.

[http://www.fruchtsaft.org/index.php?key=&menu\\_sel=13&menu\\_sel2=3&menu\\_sel3=&menu\\_sel4=&msg=43](http://www.fruchtsaft.org/index.php?key=&menu_sel=13&menu_sel2=3&menu_sel3=&menu_sel4=&msg=43). Abgerufen 2. November 2012.

**VDF Verband der deutschen Fruchtsaftindustrie** (2012b) Die beliebtesten Fruchtsäfte.

[http://www.fruchtsaft.org/index.php?key=&menu\\_sel=13&menu\\_sel2=3&menu\\_sel3=&menu\\_sel4=&msg=42](http://www.fruchtsaft.org/index.php?key=&menu_sel=13&menu_sel2=3&menu_sel3=&menu_sel4=&msg=42). Abgerufen 2. November 2012.

**Vendruscolo F, Albuquerque PM, Streit F, Esposito E, Ninow JL** (2008) Apple pomace: A versatile substrate for biotechnological applications. *Crit Rev Biotechnol* 28:1-12.

**Venkateshwarlu G, Chandravada MV, Tewari RP** (1999) Volatile flavour components of some edible mushrooms (basidiomycetes). *Flavour Frag J* 14:191-194.

**von Ranson C, Belitz H** (1992) Untersuchungen zur Struktur-Aktivitätsbeziehung bei Geruchsstoffen. 3. Mitteilung: Wahrnehmungs- und Erkennungsschwellenwerte sowie Geruchsqualitäten alicyclischer und aromatischer Aldehyde. *Z Lebensm Unters Forsch* 195:523-526.

**Wasser SP** (2010) Novel *Coprinus comatus* and *Tremella mesenterica* mushroom strains, products and extracts thereof and compositions comprising them. Palmed Teva Ltd., Israel. WO2010103519A1.

**Wei A, Mura K, Shibamoto T** (2001) Antioxidative activity of volatile chemicals extracted from beer. *J Agric Food Chem* 49:4097-4101.

**White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J** (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA (Hrsg.) *PCR protocols. A guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, S 315-322.

**Wong JM, Bernhard RA** (1988) Effect of nitrogen source on pyrazine formation. *J Agric Food Chem* 36:123-129.

**Wong KC, Lai FY** (1996) Volatile constituents from the fruits of four *Syzygium* species grown in Malaysia. *Flavour Frag J* 11:61-66.

**Worrall JJ, Yang CS** (1992) Shiitake and oyster mushroom production on apple pomace and sawdust. *HortScience* 27:1131-1133.

- Wu SM, Krings U, Zorn H, Berger RG** (2005a) Volatile compounds from the fruiting bodies of beefsteak fungus *Fistulina hepatica* (Schaeffer: Fr.) Fr. Food Chem 92:221-226.
- Wu SM, Zorn H, Krings U, Berger RG** (2005b) Characteristic volatiles from young and aged fruiting of wild *Polyporus sulfureus* (Bull.: Fr.) Fr. J Agric Food Chem 53:4524-4528.
- Xia Y, Zhang B, Li W, Xu G** (2011) Changes in volatile compound composition of *Antrodia camphorata* during solid state fermentation. J Sci Food Agric 91:2463-2470.
- Xu CC, Cai Y, Zhang JG, Ogawa M** (2007) Fermentation quality and nutritive value of a total mixed ration silage containing coffee grounds at ten or twenty percent of dry matter. J Anim Sci 85:1024-1029.
- Yanagimoto K, Ochi H, Lee K, Shibamoto T** (2004) Antioxidative activities of fractions obtained from brewed coffee. J Agric Food Chem 52:592-596.
- Yang C, Luo L, Zhang H, Yang X, Lv Y, Song H** (2010) Common aroma-active components of propolis from 23 regions of China. J Sci Food Agric 90:1268-1282.
- Yang DS, Shewfelt RL, Lee K, Kays SJ** (2008) Comparison of odor-active compounds from six distinctly different rice flavor types. J Agric Food Chem 56:2780-2787.
- Yang H, Zhang L** (2009) Changes in some components of soymilk during fermentation with the basidiomycete *Ganoderma lucidum*. Food Chem 112:1-5.
- Yoshida I, Kawamura A, Takada Y** (2004) Basidiomycetes and yeasts for manufacture of alcoholic beverages. Sapporo Holdings Ltd., Japan. JP2004298109A.
- Zehentbauer G, Reineccius GA** (2002) Determination of key aroma components of cheddar cheese using dynamic headspace dilution assay. Flavour Frag J 17:300-305.
- Zeng T, Lang S, Schneider A, von Sonntag J, Ulbrich T, Lenz V** (2002) Thermische Nutzung von Traubentresterpellets in Kleinfeuerungsanlagen < 100 KW. DBFZ Deutsches Biomasseforschungszentrum gemeinnützige GmbH, Leipzig. [http://www.mixbiopells.eu/fileadmin/user\\_upload/WP5/Update/Germany/Endbericht\\_Nutzung\\_Traubentrester\\_Final\\_geschuetzt.pdf](http://www.mixbiopells.eu/fileadmin/user_upload/WP5/Update/Germany/Endbericht_Nutzung_Traubentrester_Final_geschuetzt.pdf). Abgerufen 29. Juli 2012.
- Zheng Z, Shetty K** (2000a) Enhancement of pea (*Pisum sativum*) seedling vigour and associated phenolic content by extracts of apple pomace fermented with *Trichoderma spp.* Process Biochem 36:79-84.



**Zheng Z, Shetty K** (2000b) Solid state production of polygalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes. *Process Biochem* 35:825-830.

**Zimmermann M, Schieberle P** (2000) Important odorants of sweet bell pepper powder (*Capsicum annuum* cv. *annuum*): Differences between samples of Hungarian and Moroccan origin. *Eur Food Res Technol* 211:175-180.

**Zorn H, Fischer-Zorn M, Berger RG** (2003) A labeling study to elucidate the biosynthesis of 4-(4-hydroxyphenyl)-butan-2-one (raspberry ketone) by *Nidula niveo-tomentosa*. *Appl Environ Microbiol* 69:367-372.

**Zou X** (2006) Fed-batch fermentation for hyperproduction of polysaccharide and ergosterol by medicinal mushroom *Agaricus brasiliensis*. *Process Biochem* 41:970-974.

## 7 Anhang

### 7.1 Biotransformation von Nebenströmen der Lebensmittelindustrie zu hochwertigen Aromaextrakten

#### Screening und Kulturparameter

Tabelle 7.1: Geruchseindrücke der Kultivierung von *W. cocos* mit Kakaopulver ( $WCO_{KP}$ )

Kultivierungs- dauer [d]	$KP_{BW}$	I	$WCO_{BW}$	I	$WCO_{KP}$	I
3	Kakaopulver, wässrig	2	Kräuter, Zitrone, frisch, Thymian	3	Schokolade, Orange, Alkohol	3
6	wässrig, Kakao	3	Zitrone, Kräuter, frisch	4	Zitrone, Citrus, Schokolade	3-4
11	wässrig, Kakao	3	Zitrone, krautig, herb, Brühe	3-4	Orange, Schokolade	3-4
13	wässrig, Kakao	3	Zitrone, krautig, herb, Brühe, Zitronenmelisse	3-4	Zitrone, Limette, frisch, Kakao	3

BW: Blindwert; I= Geruchsintensität (siehe 5.2.6)

Tabelle 7.2: Geruchseindrücke der Kultivierung von *W. cocos* mit unbehandeltem Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer;  $WCO_{WTu}$ )

Kultivierungs- dauer [d]	$WTu_{BW}$	I	$WCO_{BW}$	I	$WCO_{WTu}$	I
3	Hefe, Teig, trocken, säuerlich, Trester	2-3	Zitrone, Kräuter, Zitronenmelisse, frisch	3-4	blumig, Zitrone, frisch, Kamille	3
6	dumpf, Weintrester, staubig	2-3	Zitrone, Kräuter, Zitronenmelisse, frisch	3-4	Zitrone, frisch, blumig, würzig	2-3
8	dumpf, Weintrester, staubig	2-3	Zitrone, Kräuter, Zitronenmelisse, frisch	3-4	parfümisch, blumig	2

BW: Blindwert; I= Geruchsintensität (siehe 5.2.6)

Tabelle 7.3: Geruchseindrücke der Kultivierung von *P. sapidus* mit lyophilisiertem Apfeltrester ( $PSA_{AT}$ )

Kultivierungs- dauer [d]	$AT_{BW}$	I	$PSA_{BW}$	I	$PSA_{AT}$	I
2	Apfelmost	2	geräucherte Forelle	2	rauchig, fruchtig, Apfelsaft (klar), gekochter Apfel	2
4	Apfelmost, erdig	2-3	Pilz, geräucherte Forelle	2	gekochter Apfel, Apfelwein, rauchig, alkoholisch	2
7	Apfelmost, Oblaten	3	Pilz, Essig, säuerlich	2	säuerlich, gekochter Apfel	1-2
9	Apfelmost, stumpf, Trester	2	warm, Orange	1	Popcorn, geröstet, Apfel	2

BW: Blindwert; I= Geruchsintensität (siehe 5.2.6)

Tabelle 7.4: Geruchseindrücke der Kultivierung von *P. sapidus* mit unbehandeltem Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer;  $PSA_{WTu}$ )

Kultivierungs- dauer [d]	$WTu_{BW}$	I	$PSA_{BW}$	I	$PSA_{WTu}$	I
2	Hefe, Teig, trocken, säuerlich, Trester	2-3	neutral, Anisaldehyd	1	grün, frisch, Kiwi	3
6	Trester, dumpf, staubig	2	Anisaldehyd	2	grün, frisch, Kiwi, grüne Traube	2
8	Trester, dumpf, staubig	2	Anisaldehyd	2	frisch, Mottenkugeln	0-1

BW: Blindwert; I= Geruchsintensität (siehe 5.2.6)

Tabelle 7.5: Geruchseindrücke der Kultivierung von *T. chioneus* mit unbehandeltem Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer;  $TCH_{WTu}$ )

Kultivierungs- dauer [d]	$WTu_{BW}$	I	$TCH_{BW}$	I	$TCH_{WTu}$	I
3	Hefe, Teig, trocken, säuerlich, Trester	2-3	staubig, süßlich, Anisaldehyd	1-2	süßlich, fruchtig, Rose	2
4	Trester, dumpf, staubig	2-3	Brühe, Anisaldehyd	2	fruchtig, süßlich, schwer, Trompetenbaumb Blüten	2-3
7	Trester, dumpf, staubig	2	Kunststoff, süßlich	1	metallisch, sauer, Orange	2

BW: Blindwert; I= Geruchsintensität (siehe 5.2.6)

Tabelle 7.6: Geruchseindrücke der Kultivierung von *T. chioneus* mit lyophilisiertem Apfeltrester ( $TCH_{AT}$ )

Kultivierungs- dauer [d]	$AT_{BW}$	I	$TCH_{BW}$	I	$TCH_{AT}$	I
3	alter Apfelmost	3	staubig, süßlich, Anisaldehyd	1-2	gekochter Apfel	1
5	alter Apfelmost	3	Brühe, Anisaldehyd	2	fruchtig, Kompott, Pflaumenmus	3
7	alter Apfelmost	3	Kunststoff, süßlich	2	neutral, süßlich	0

BW: Blindwert; I= Geruchsintensität (siehe 5.2.6)

Tabelle 7.7: Geruchseindrücke der Kultivierung von *P. eryngii* mit Teigbruch ( $PER_{TB}$ )

Kultivierungs- dauer [d]	$TB_{BW}$	I	$PER_{BW}$	I	$PER_{TB}$	I
2	Schokolade, wässrig, Rührkuchenteig	2	staubig, süßlich	2-3	Nuss, Haselnuss, süßlich, Schokolade	2-3
4	Schokolade, wässrig, Rührkuchenteig	2	staubig, süßlich	0-1	geröstet, animalisch	3
7	Schokolade, wässrig, Rührkuchenteig	2	Anisaldehyd	2	neutral, Backwaren	0-1

BW: Blindwert; I= Geruchsintensität (siehe 5.2.6)

Tabelle 7.8: Geruchseindrücke der Kultivierung von *P. eryngii* mit Waffelbruch ( $PER_{WB}$ )

Kultivierungs- dauer [d]	WB <sub>BW</sub>	I	PER <sub>BW</sub>	I	PER <sub>WB</sub>	I
2	Mehl, wässrig	2	staubig, süßlich	2-3	staubig, Nuss, Haselnuss	2
4	Mehl, wässrig	2	staubig, süßlich	0-1	Lebkuchen, Haselnusskeks	1
7	Mehl, wässrig	2	Anisaldehyd	2	Anisaldehyd, Keller, stechend	2

BW: Blindwert; I= Geruchsintensität (siehe 5.2.6)

Tabelle 7.9: Geruchseindrücke der Kultivierung von *N. niveo-tomentosa* mit Teigbruch ( $NNI_{TB}$ )

Kultivierungs- dauer [d]	TB <sub>BW</sub>	I	NNI <sub>BW</sub>	I	NNI <sub>TB</sub>	I
2	Schokolade, wässrig, Rührkuchenteig	2	animalisch, Rauch	1-2	gebrannte Mandeln, Süßwaren, süßlich	2-3
4	Schokolade, wässrig, Rührkuchenteig	2	süßlich, Rauch	1-2	vergoren, Teig	0-1
7	Schokolade, wässrig, Rührkuchenteig	2	süßlich, Rauch	1-2	vergoren, Teig	0-1

BW: Blindwert; I= Geruchsintensität (siehe 5.2.6)

Tabelle 7.10: Geruchseindrücke der Kultivierung von *M. cohortalis* mit unbehandeltem Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer;  $MCO_{WTu}$ )

Kultivierungs- dauer [d]	WTu <sub>BW</sub>	I	MCO <sub>BW</sub>	I	MCO <sub>WTu</sub>	I
2	dumpf, Weintrester, staubig	2-3	staubig, neutral	0-1	grün, frisch, kräuterig	2
7	dumpf, Weintrester, staubig	2-3	staubig, neutral	1	staubig, beißend, feucht	0-1

BW: Blindwert; I= Geruchsintensität (siehe 5.2.6)

Tabelle 7.11: Geruchseindrücke der Kultivierung von *C. lignatilis* mit Kakaopulver ( $CLI_{KP}$ )

Kultivierungs- dauer [d]	KP <sub>BW</sub>	I	CLI <sub>BW</sub>	I	CLI <sub>KP</sub>	I
3	Kakao, wässrig	2	staubig, muffig	2	Kakao, wässrig, würzig	1-2
5	Kakao, wässrig	2	chlorig, muffig, schimmelig	2	Popcorn, Nuss, süßlich (kein Kakao)	3
7	Kakao, wässrig	2	chlorig, muffig, schimmelig	2	geröstet, Nuss, chlorig	3-4

BW: Blindwert; I= Geruchsintensität (siehe 5.2.6)

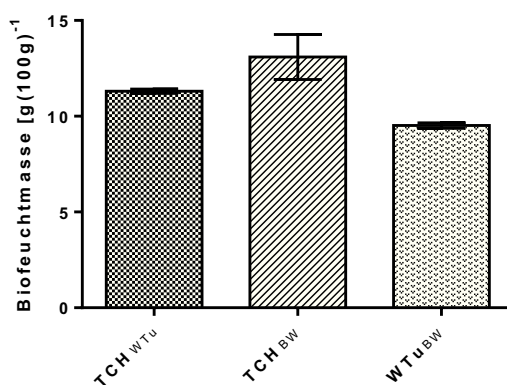


Abbildung 7.1: Biofeuchtmass  $[g(100g)^{-1}]$  der Biotransformation von unbehandeltem Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer) durch *T. chioneus* ( $TCH_{WTu}$ ) mit den zugehörigen Substrat- ( $WTu_{BW}$ ) und Pilzblindwerten ( $TCH_{BW}$ ) (Kulturtag 4)

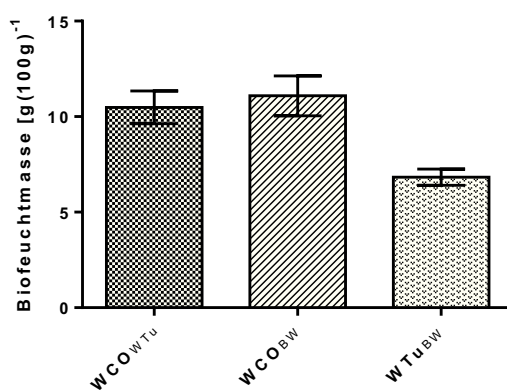


Abbildung 7.2: Biofeuchtmass  $[g(100g)^{-1}]$  der Biotransformation von unbehandeltem Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer) durch *W. cocos* ( $WCO_{WTu}$ ) mit den zugehörigen Substrat- ( $WTu_{BW}$ ) und Pilzblindwerten ( $WCO_{BW}$ ) (Kulturtag 6)

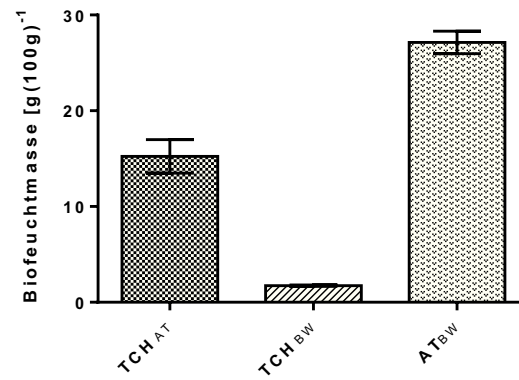


Abbildung 7.3: Biofeuchtmasse [g(100g)<sup>-1</sup>] der Biotransformation von lyophilisiertem Apfeltrester durch *T. chioneus* (TCH<sub>AT</sub>) mit den zugehörigen Substrat- (AT<sub>BW</sub>) und Pilzblindwerten (TCH<sub>BW</sub>) (Kulturtag 4)

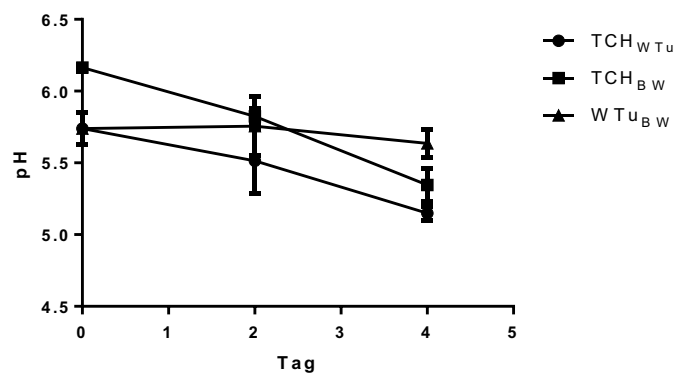


Abbildung 7.4: pH-Werte der Kultivierung von *T. chioneus* mit unbehandeltem Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer) (TCH<sub>WTu</sub>) und den zugehörigen Substrat- (WTu<sub>BW</sub>) und Pilzblindwerten (TCH<sub>BW</sub>) im Kulturverlauf

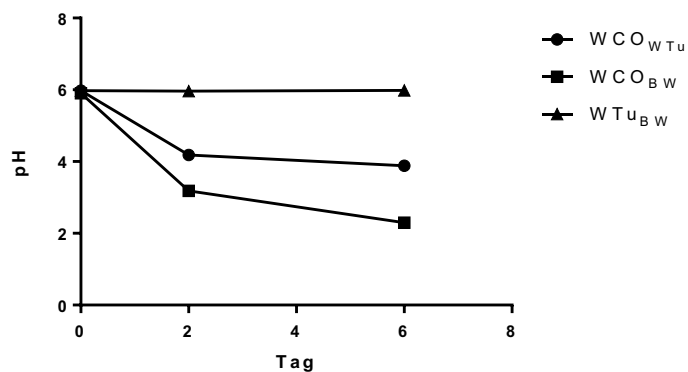


Abbildung 7.5: pH-Werte der Kultivierung von *W. cocos* mit unbehandeltem Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer) (WCO<sub>WTu</sub>) und den zugehörigen Substrat- (WTu<sub>BW</sub>) und Pilzblindwerten (WCO<sub>BW</sub>) im Kulturverlauf

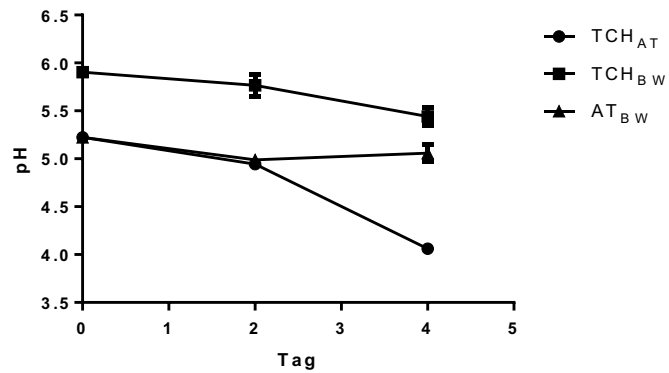


Abbildung 7.6: pH-Werte der Kultivierung von *T. chioneus* mit lyophilisiertem Apfeltrester (TCH<sub>AT</sub>) und den zugehörigen Substrat- (AT<sub>BW</sub>) und Pilzblindwerten (TCH<sub>BW</sub>) im Kulturverlauf

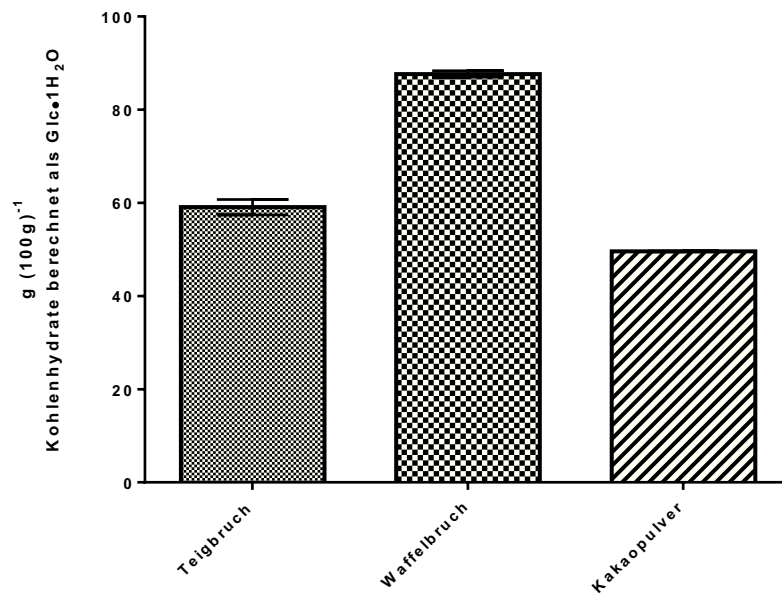


Abbildung 7.7: Gesamtkohlenhydratgehalt des Teigbruchs, des Waffelbruchs und des Kakaopulvers berechnet als Glucose-Monohydrat (5.2.4.1)



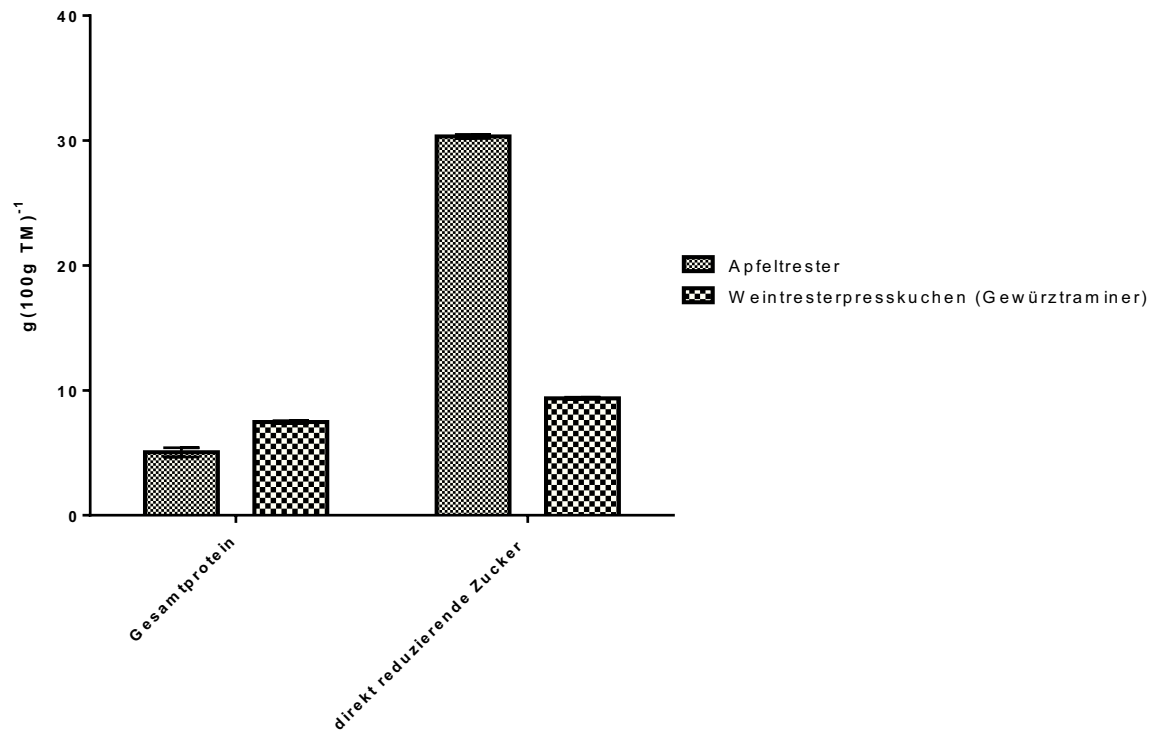


Abbildung 7.8: Gehalt an Gesamtprotein und direkt reduzierenden Zuckern der Substrate Apfeltrester und Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer)

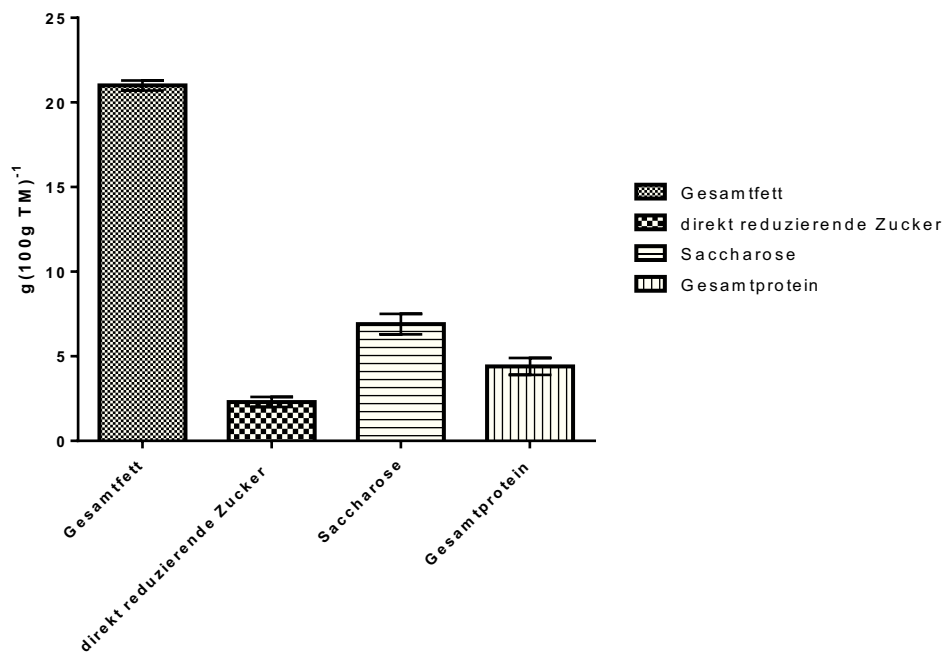


Abbildung 7.9: Gesamtfett, direkt reduzierende Zucker, Saccharosegehalt und Gesamtprotein des Weintresters (Gewürztraminer, Gengenbach/Baden)

Biotransformation von Weintresterpresskuchen durch *T. chioneus*

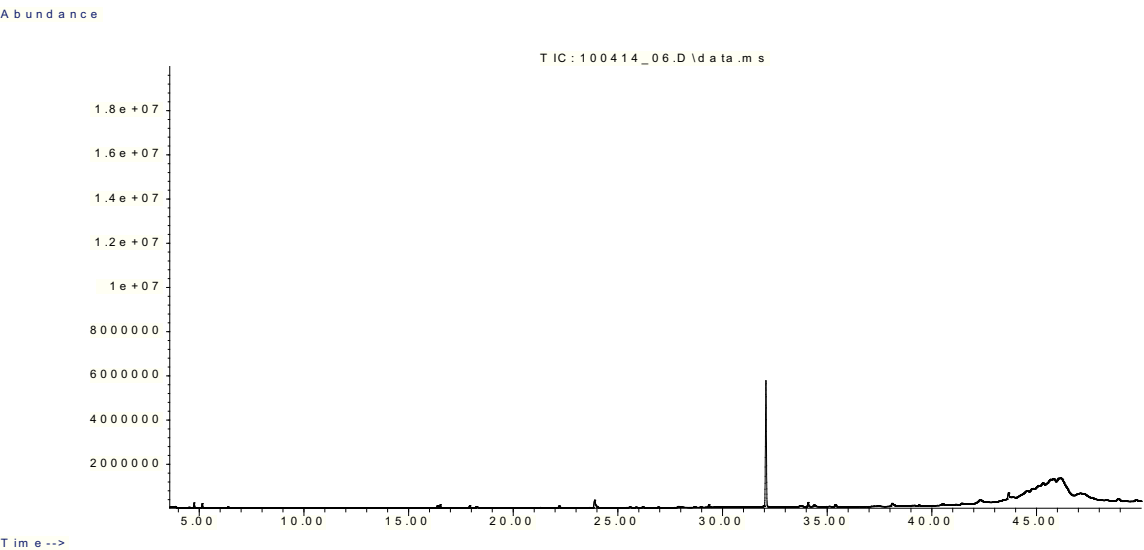


Abbildung 7.10: GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) des Blindwertes *T. chioneus* ( $TCH_{BW}$ , Kulturtag 4)

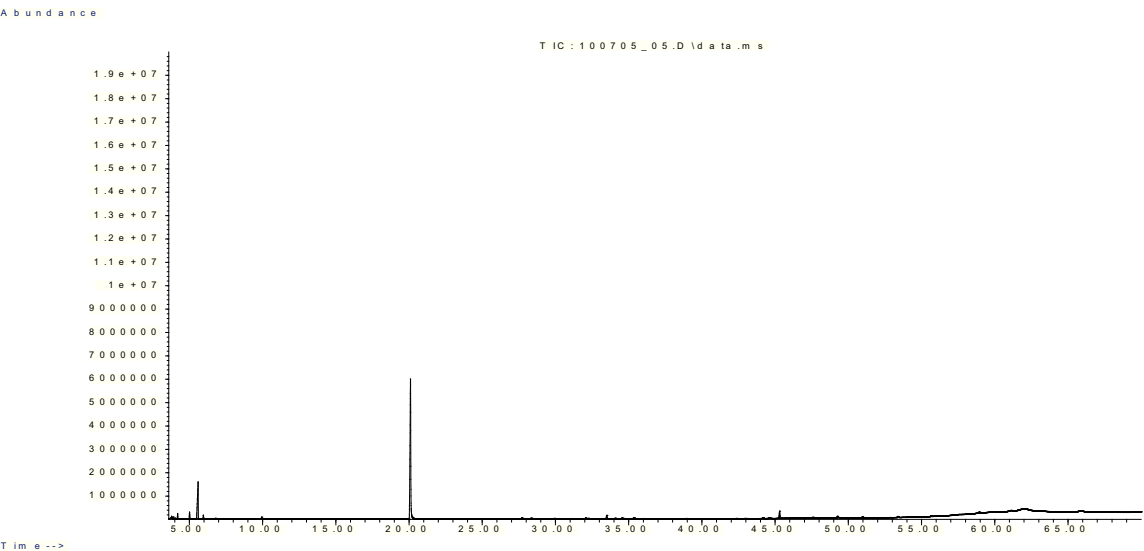


Abbildung 7.11: GC/MS-Chromatogramm (DB-5MS) des Blindwertes *T. chioneus* ( $TCH_{BW}$ , Kulturtag 4)

Tabelle 7.12: Massenspektren von Furfural ( $TCH_{BW}$ , Kulturtag 4) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax) und einer unpolaren Säule (DB-5MS)

Furfural (HP-Innowax)	Furfural (DB-5MS)
<p>(Text File) Scan 3995 (16.517 min): 100414_01.D\data.ms</p>	<p>(Text File) Scan 734 (5.963 min): 100705_05.D\data.ms</p>

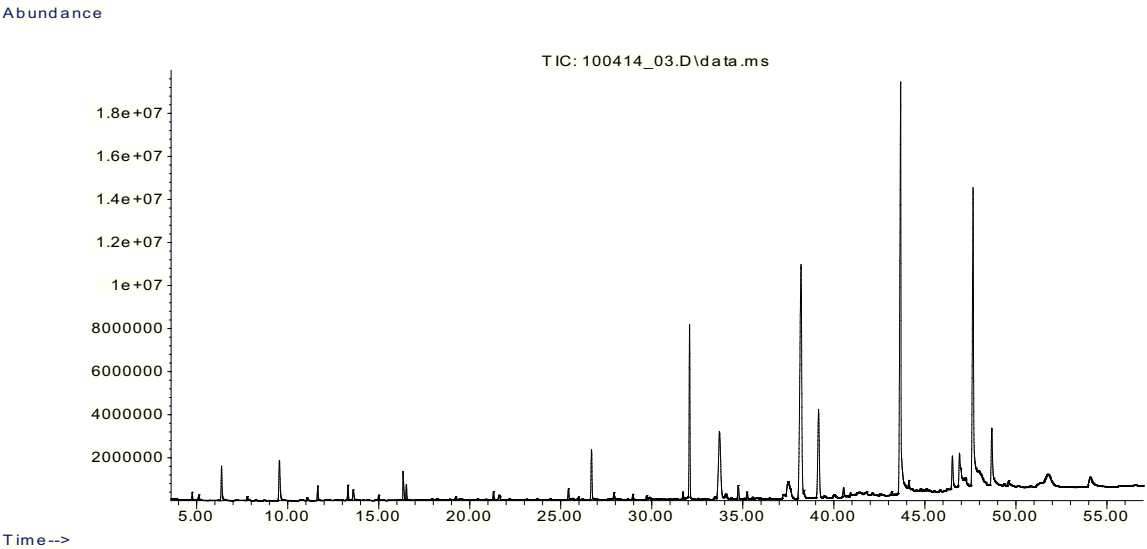


Abbildung 7.12: GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) des Blindwertes von unbehandeltem Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer, WTu<sub>BW</sub>, Kulturtag 4)

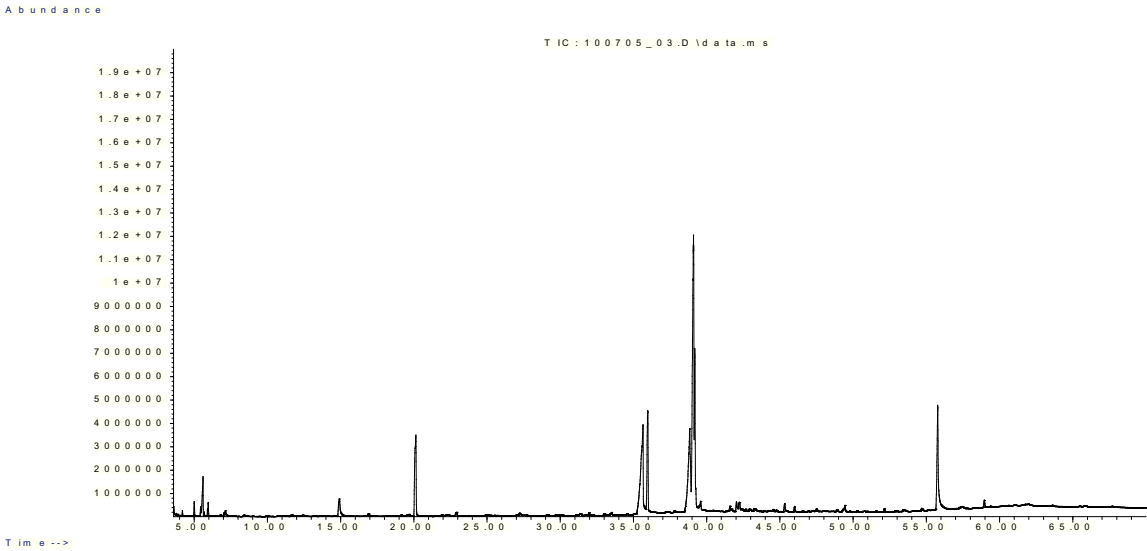
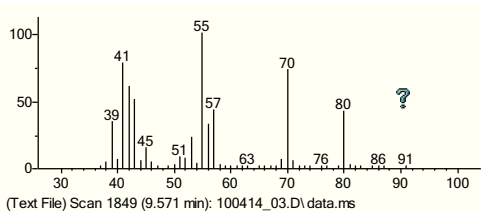
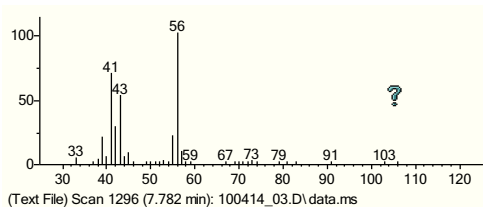


Abbildung 7.13: GC/MS-Chromatogramm (DB-5MS) des Blindwertes von unbehandeltem Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer, WTu<sub>BW</sub>, Kulturtag 4)

Tabelle 7.13: Massenspektren von Butan-1-ol und 3-Methylbutan-1-ol (WTu<sub>BW</sub>, Kulturtag 4) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)

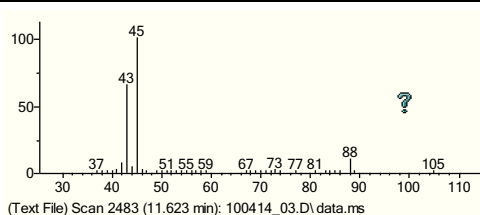
Butan-1-ol (HP-Innowax)

3-Methylbutan-1-ol (HP-Innowax)

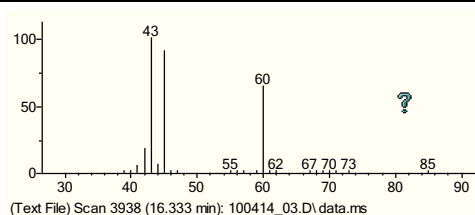


**Tabelle 7.14:** Massenspektren von 3-Hydroxybutan-2-on und Essigsäure ( $WTu_{BW}$ , Kulturtag 4) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)

3-Hydroxybutan-2-on (HP-Innowax)

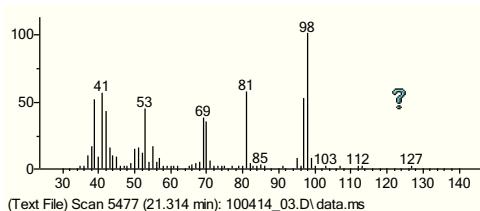


Essigsäure (HP-Innowax)

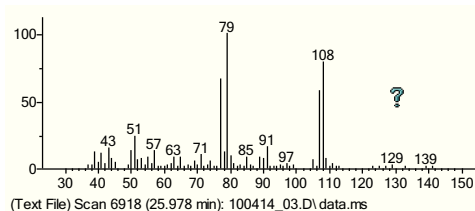


**Tabelle 7.15:** Massenspektren von 2-Furanmethanol und Benzylalkohol ( $WTu_{BW}$ , Kulturtag 4) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)

2-Furanmethanol (HP-Innowax)

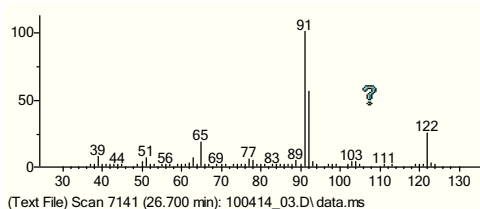


Benzylalkohol (HP-Innowax)

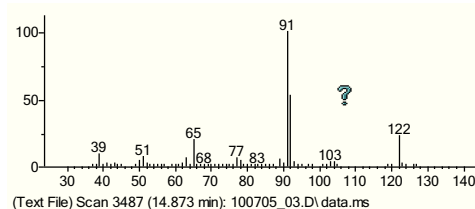


**Tabelle 7.16:** Massenspektren von 2-Phenylethanol ( $WTu_{BW}$ , Kulturtag 4) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax) und einer unpolaren Säule (DB-5MS)

2-Phenylethanol (HP-Innowax)

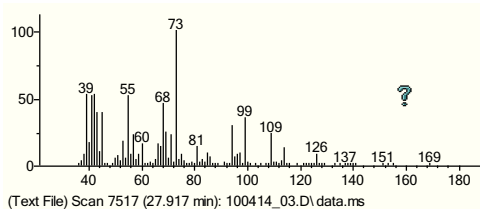


2-Phenylethanol (DB-5MS)

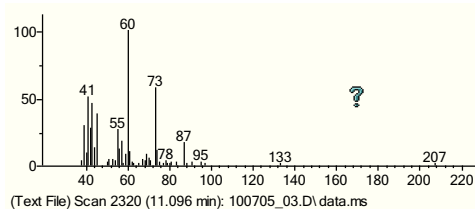


**Tabelle 7.17:** Massenspektren von 2-Hexensäure ( $WTu_{BW}$ , Kulturtag 4) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax) und einer unpolaren Säule (DB-5MS)

2-Hexensäure (HP-Innowax)



2-Hexensäure (DB-5MS)



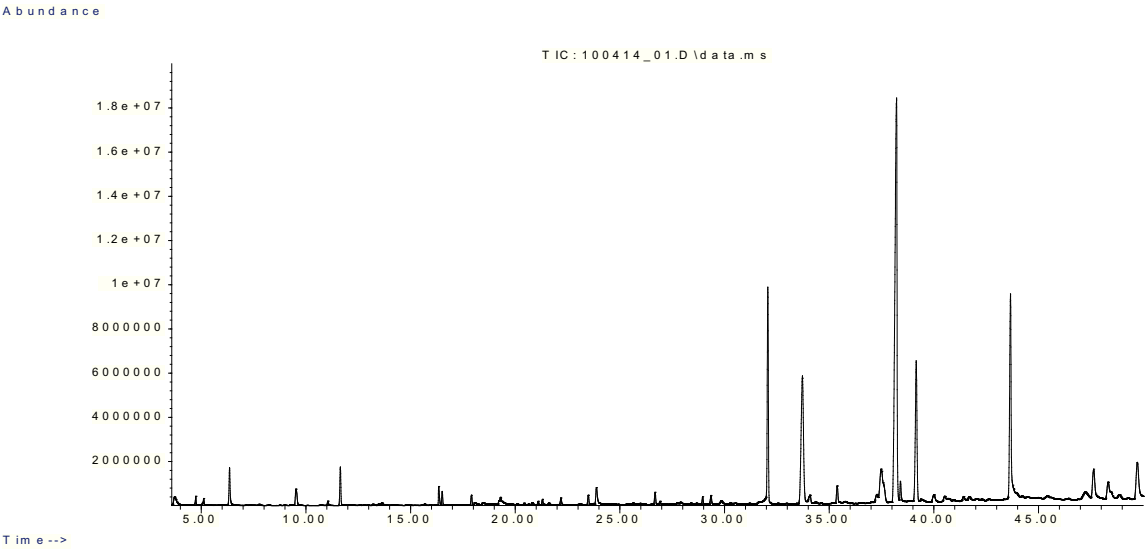


Abbildung 7.14: GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) der Biotransformation von unbehandeltem Weintresterpresskuchen durch *T. chioneus* ( $TCH_{WTu}$ , Kulturtag 4)

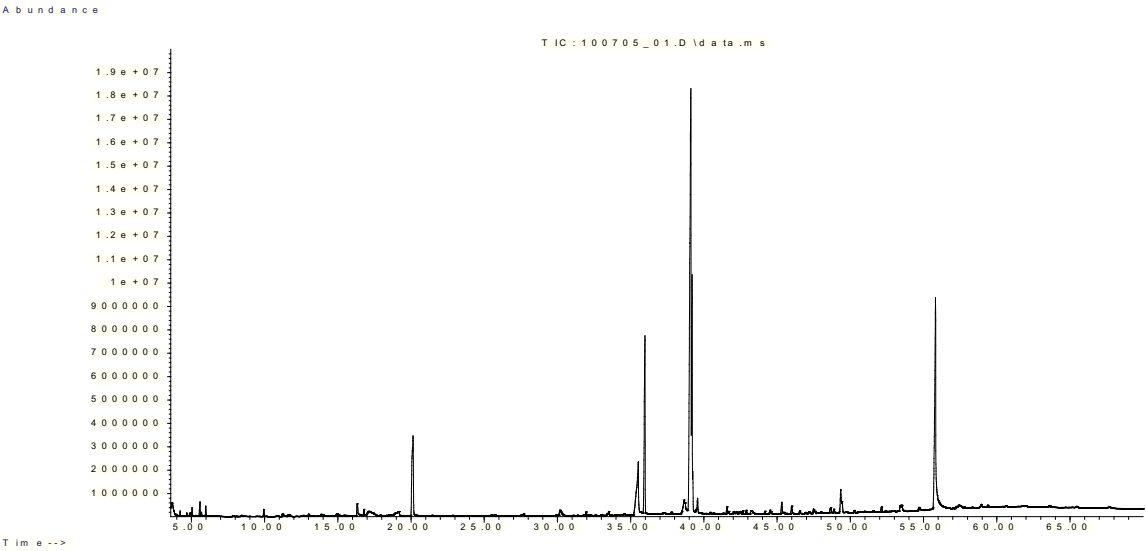
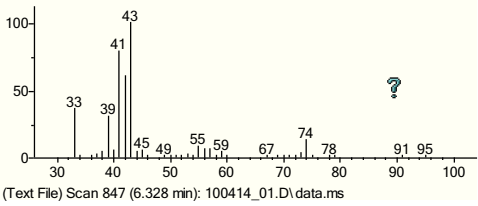


Abbildung 7.15: GC/MS-Chromatogramm (DB-5MS) der Biotransformation von unbehandeltem Weintresterpresskuchen durch *T. chioneus* ( $TCH_{WTu}$ , Kulturtag 4)

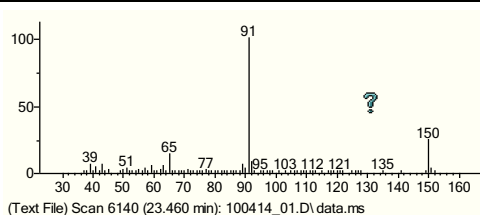
Tabelle 7.18: Massenspektrum von 2-Methylpropan-1-ol ( $TCH_{WTu}$ , Kulturtag 4) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)

2-Methylpropan-1-ol (HP-Innowax)

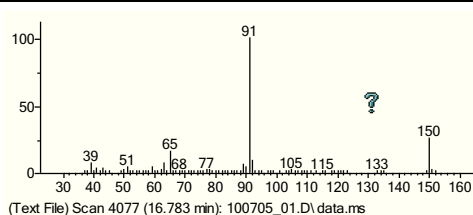


**Tabelle 7.19:** Massenspektren von Phenyllessigsäuremethylester ( $TCH_{WTU}$ , Kulturtag 4) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax) und einer unpolaren Säule (DB-5MS)

Phenyllessigsäuremethylester (HP-Innowax)

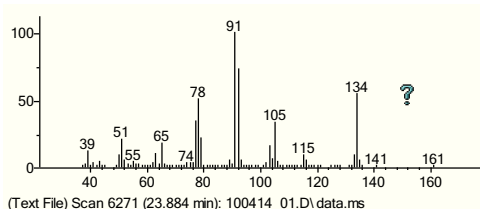


Phenyllessigsäuremethylester (DB-5MS)

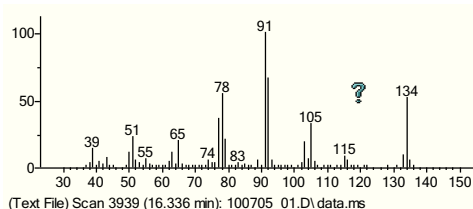


**Tabelle 7.20:** Massenspektren von 3-Phenylpropanal ( $TCH_{WTU}$ , Kulturtag 4) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax) und einer unpolaren Säule (DB-5MS)

3-Phenylpropanal (HP-Innowax)

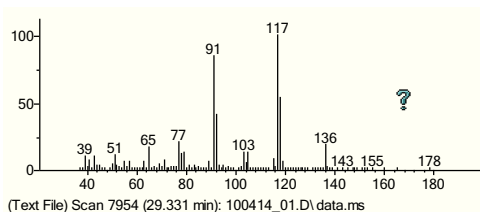


3-Phenylpropanal (DB-5MS)

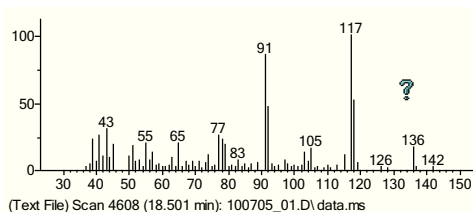


**Tabelle 7.21:** Massenspektren von 3-Phenylpropanol ( $TCH_{WTU}$ , Kulturtag 4) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax) und einer unpolaren Säule (DB-5MS)

3-Phenylpropanol (HP-Innowax)

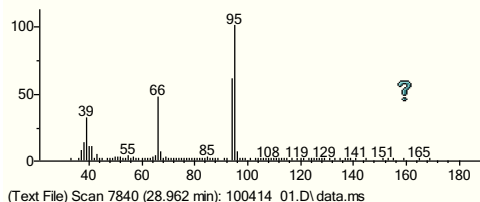


3-Phenylpropanol (DB-5MS)



**Tabelle 7.22:** Massenspektren von 1H-Pyrrrol-2-carboxaldehyd ( $TCH_{WTU}$ , Kulturtag 4) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax) und einer unpolaren Säule (DB-5MS)

1H-Pyrrrol-2-carboxaldehyd (HP-Innowax)



1H-Pyrrrol-2-carboxaldehyd (DB-5MS)

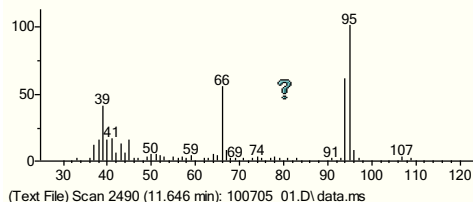
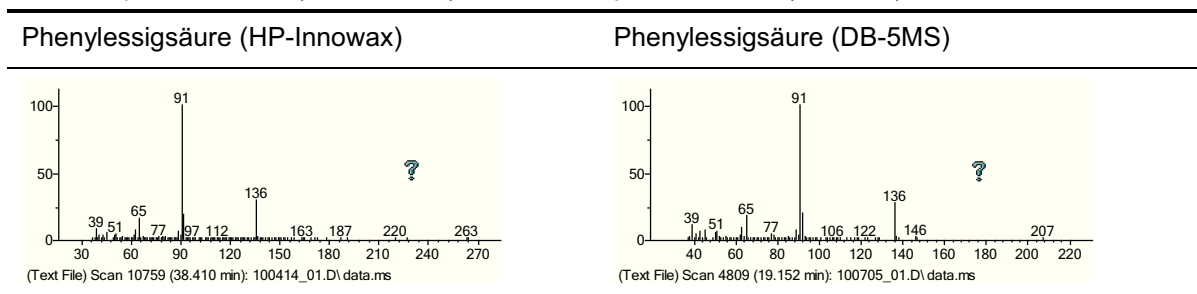


Tabelle 7.23: Massenspektren von Phenyllessigsäure ( $TCH_{WTU}$ , Kulturtag 4) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax) und einer unpolaren Säule (DB-5MS)



### Biotransformation von lyophilisiertem Apfeltrester durch *T. chioneus*

Im Folgenden werden nur Massenspektren der Substanzen aufgeführt, die noch nicht gezeigt wurden.

Abundance

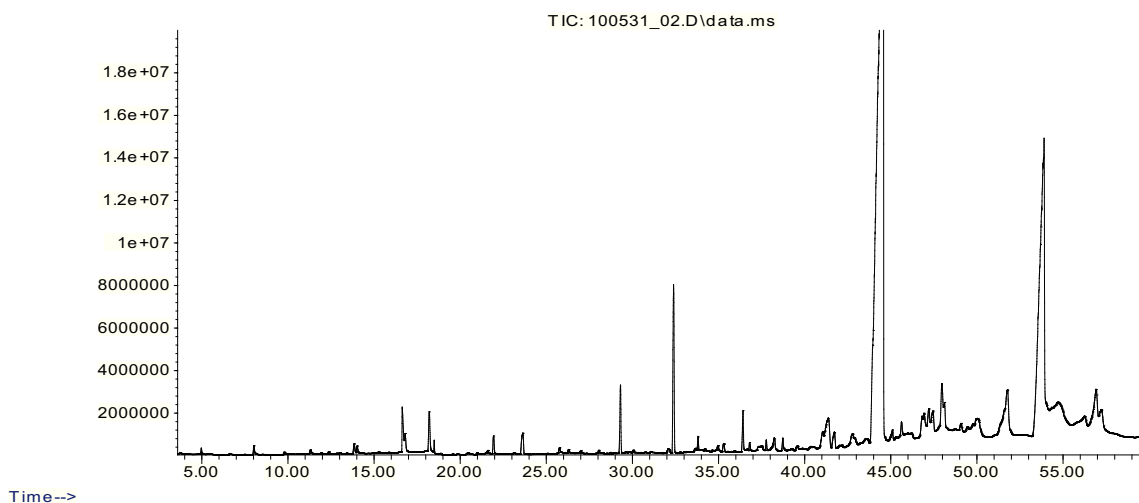


Abbildung 7.16: GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) des Blindwertes von lyophilisiertem Apfeltrester ( $AT_{BW}$ , Kulturtag 4)

Abundance

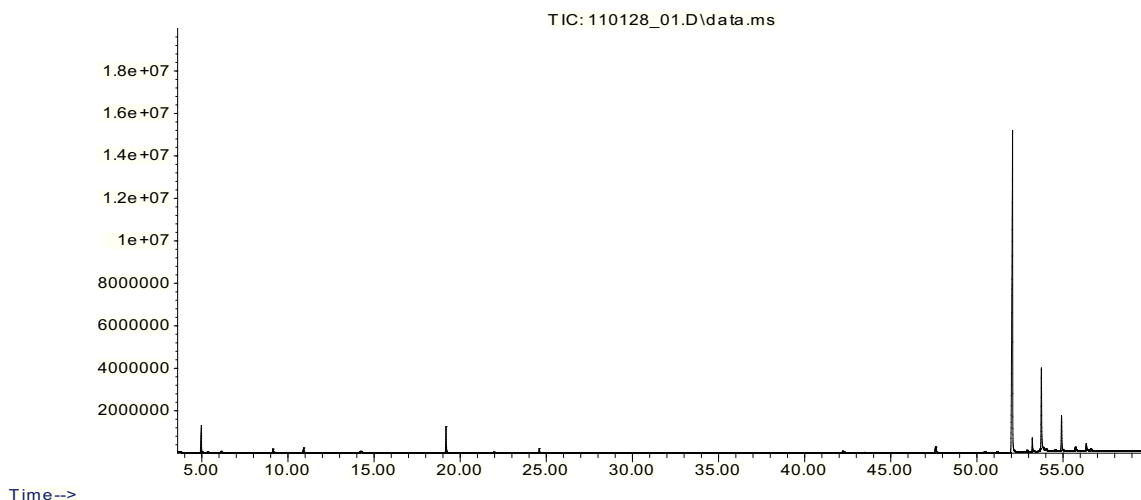


Abbildung 7.17: GC/MS-Chromatogramm (DB-5MS) des Blindwertes von lyophilisiertem Apfeltrester ( $AT_{BW}$ , Kulturtag 4)

Tabelle 7.24: Massenspektrum von 4-Methylpyrimidin ( $AT_{BW}$ , Kulturtag 4) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)

4-Methylpyrimidin (HP-Innowax)

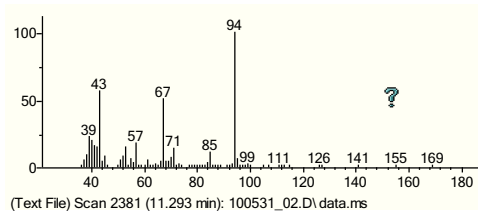
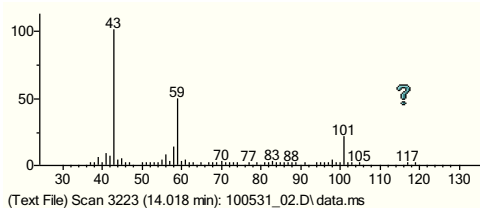


Tabelle 7.25: Massenspektren von 4-Hydroxy-4-methylpentan-2-on ( $AT_{BW}$ , Kulturtag 4) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax) und einer unpolaren Säule (DB-5MS)

4-Hydroxy-4-methylpentan-2-on (HP-Innowax)



4-Hydroxy-4-methylpentan-2-on (DB-5MS)

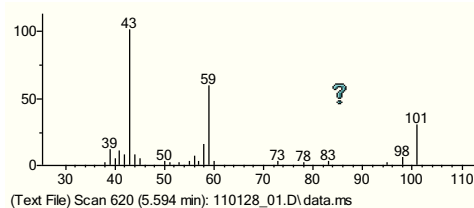
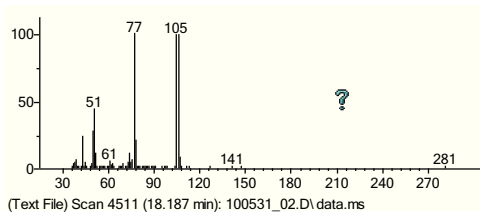


Tabelle 7.26: Massenspektren von Benzaldehyd ( $AT_{BW}$ , Kulturtag 4) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax) und einer unpolaren Säule (DB-5MS)

Benzaldehyd (HP-Innowax)



Benzaldehyd (DB-5MS)

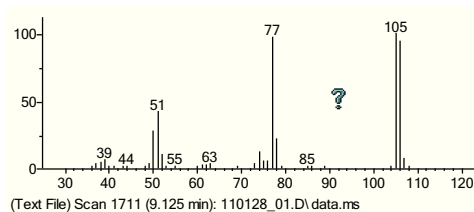
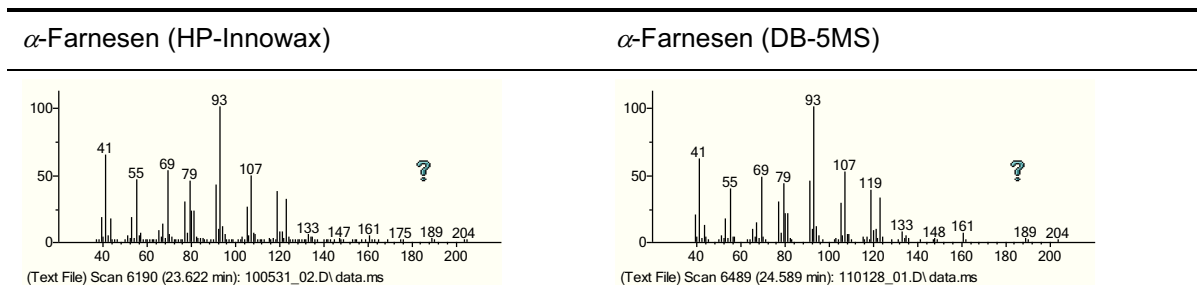




Tabelle 7.27: Massenspektren von  $\alpha$ -Farnesen ( $AT_{BW}$ , Kulturtag 4) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax) und einer unpolaren Säule (DB-5MS)



Abundance

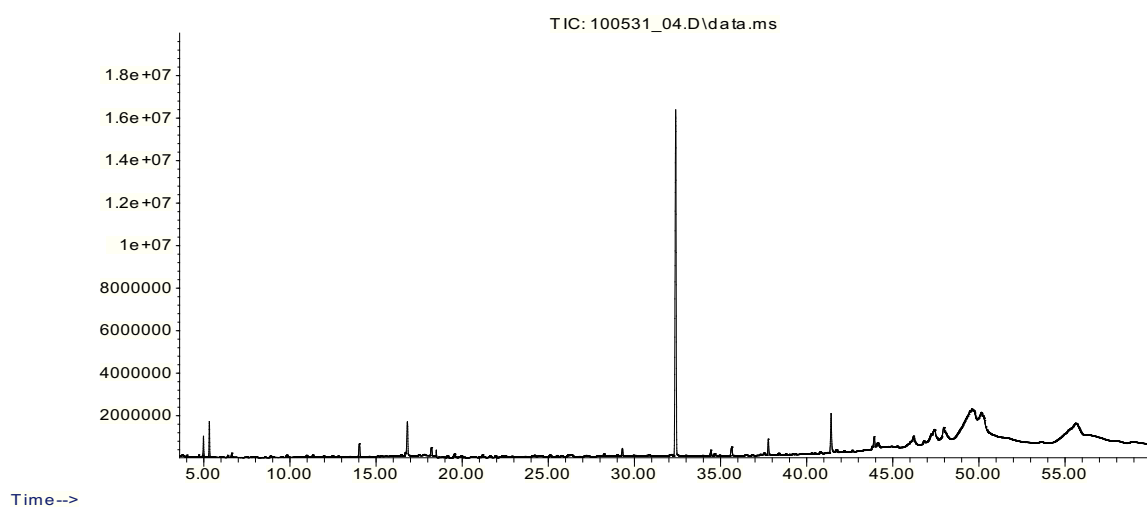


Abbildung 7.18: GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) des Blindwertes T. chioneus ( $TCH_{BW}$ , Kulturtag 4)

Abundance

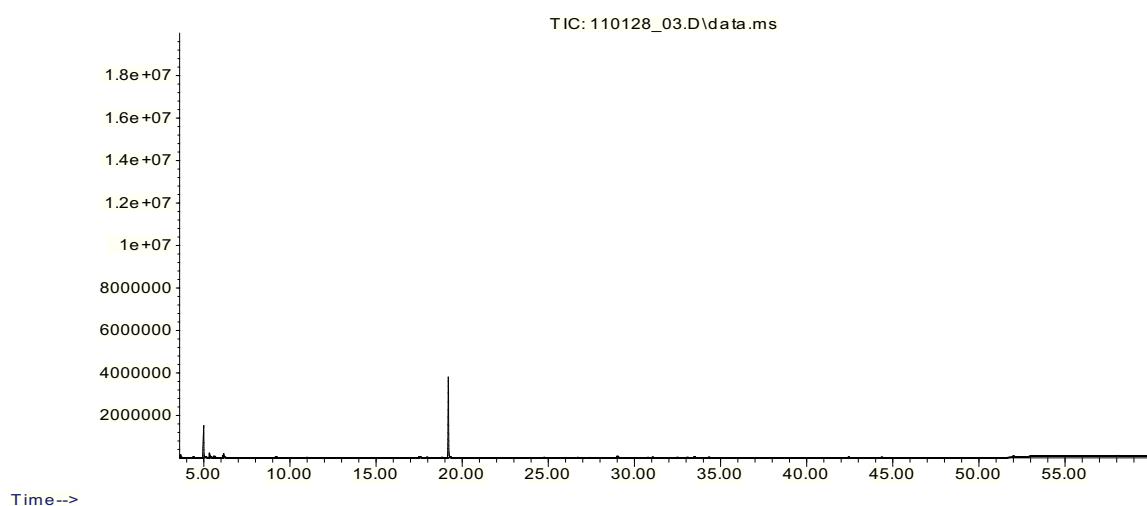
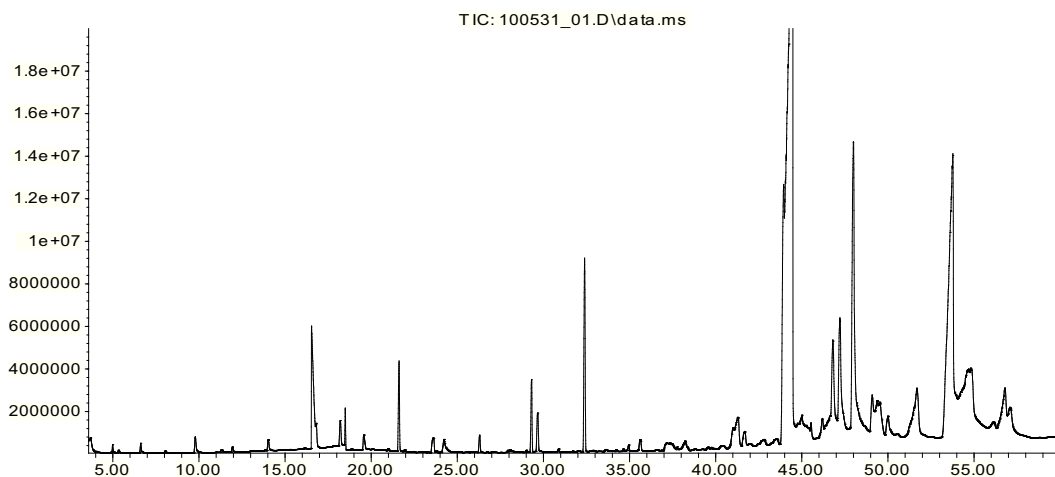


Abbildung 7.19: GC/MS-Chromatogramm (DB-5MS) des Blindwertes T. chioneus ( $TCH_{BW}$ , Kulturtag 4)

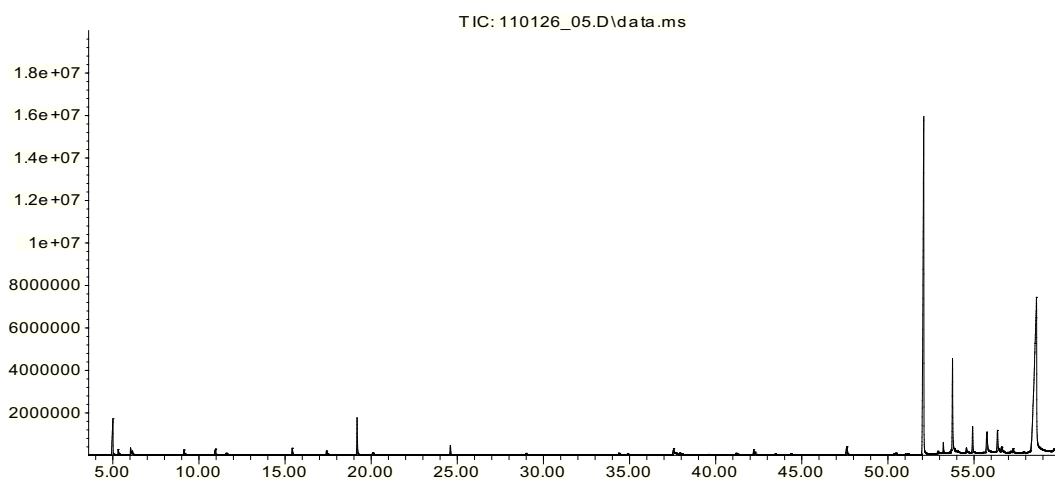
Abundance



Time--&gt;

Abbildung 7.20: GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) der Biotransformation von lyophilisiertem Apfeltrester durch *T. chioneus* ( $TCH_{AT}$ , Kulturtag 4)

Abundance



Time--&gt;

Abbildung 7.21: GC/MS-Chromatogramm (DB-5MS) der Biotransformation von lyophilisiertem Apfeltrester durch *T. chioneus* ( $TCH_{AT}$ , Kulturtag 4)

**Biotransformation von Weintresterpresskuchen durch *W. cocos***

Im Folgenden werden nur Massenspektren der Substanzen aufgeführt, die noch nicht gezeigt wurden.

Abundance

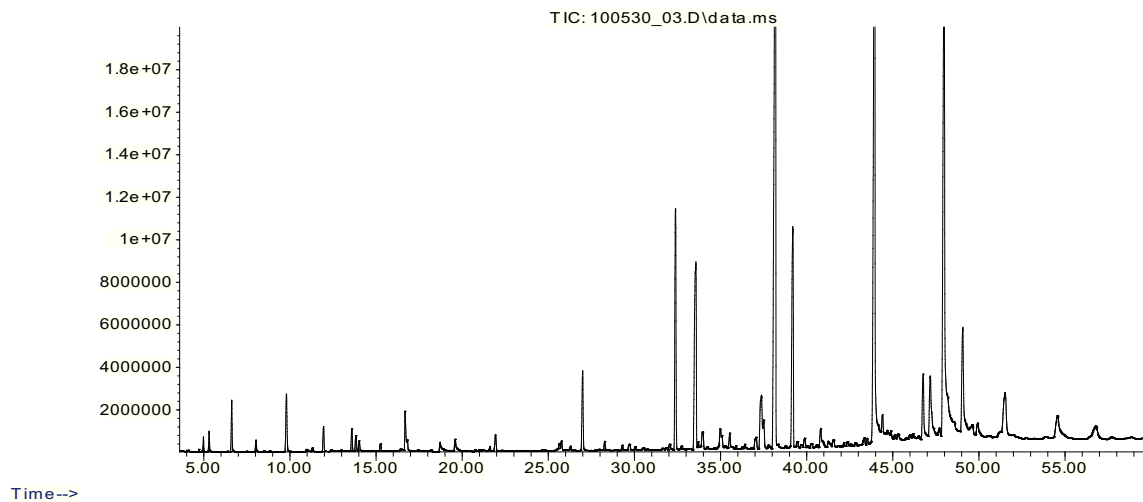


Abbildung 7.22: GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) des Blindwertes von unbehandeltem Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer) ( $WTu_{BW}$ , Kulturtag 6)

Abundance

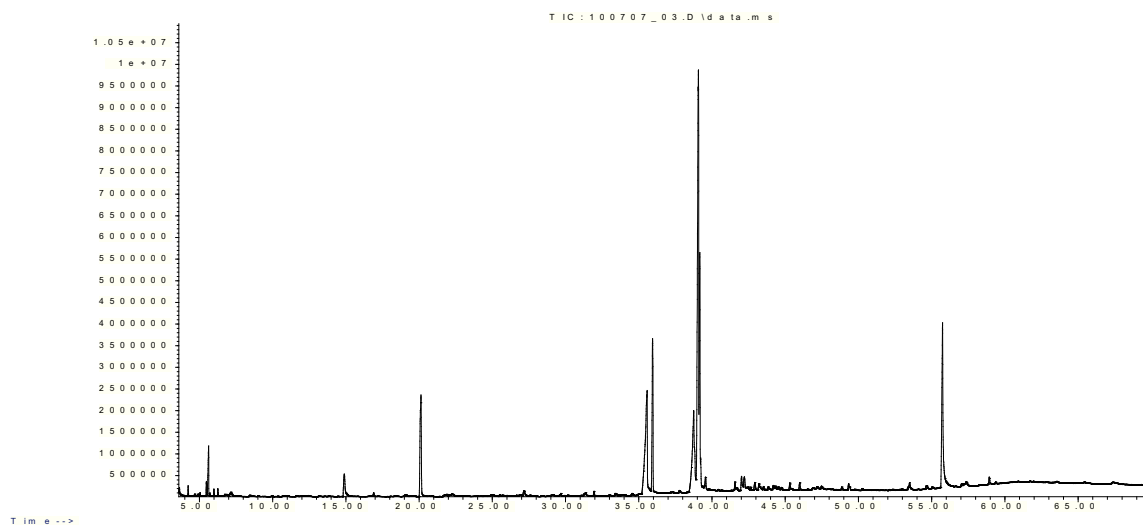


Abbildung 7.23: GC/MS-Chromatogramm (DB-5MS) des Blindwertes von unbehandeltem Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer,  $WTu_{BW}$ , Kulturtag 6)

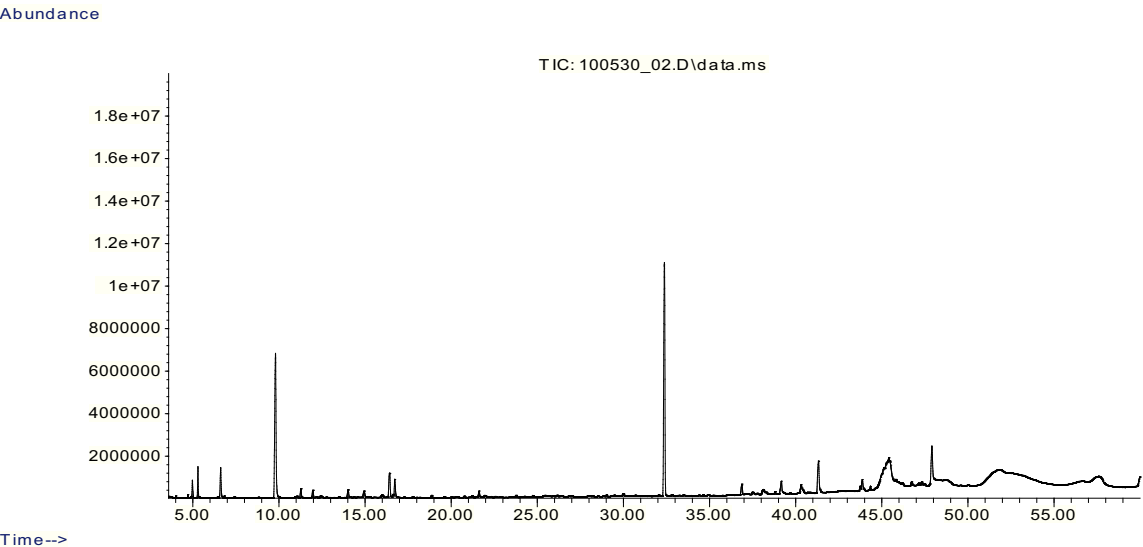


Abbildung 7.24: GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) des Blindwertes W. cocos ( $WCO_{BW}$ , Kulturtag 6)

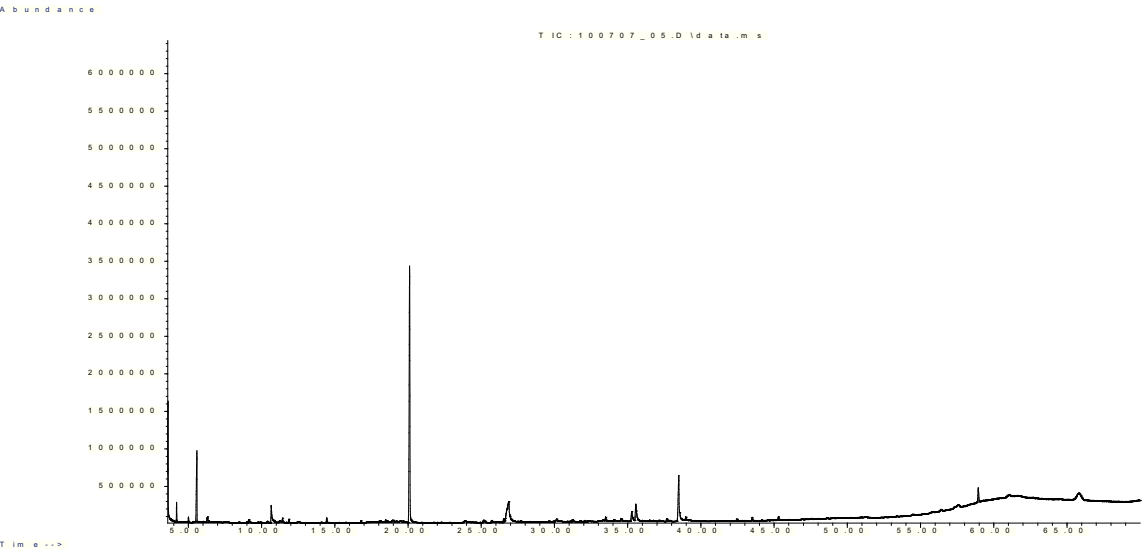


Abbildung 7.25: GC/MS-Chromatogramm (DB-5MS) des Blindwertes W. cocos ( $WCO_{BW}$ , Kulturtag 6)

Tabelle 7.28: Massenspektrum von 2-Methylbutan-1-ol ( $WCO_{BW}$ , Kulturtag 6) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)

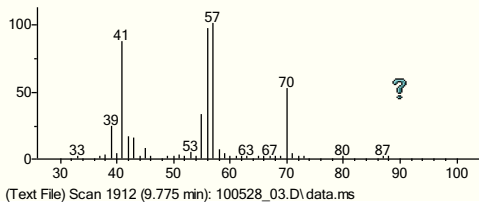
2-Methylbutan-1-ol (HP-Innowax)	
	
(Text File) Scan 1912 (9.775 min): 100528_03.D\data.ms	

Tabelle 7.29: Massenspektren von Oct-1-en-3-ol ( $WCO_{BW}$ , Kulturtag 6) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax) und einer unpolaren Säule (DB-5MS)

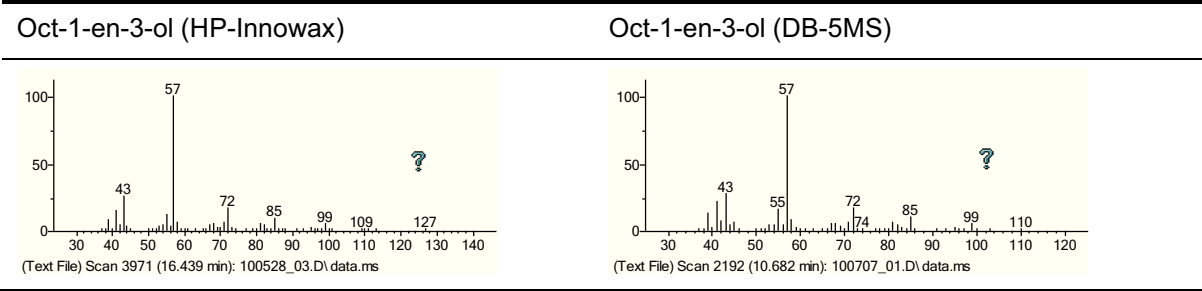
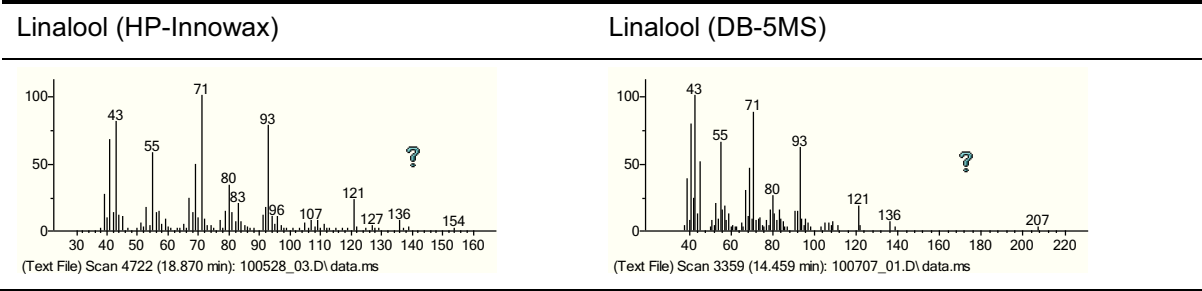


Tabelle 7.30: Massenspektren von Linalool ( $WCO_{BW}$ , Kulturtag 6) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax) und einer unpolaren Säule (DB-5MS)



Abundance

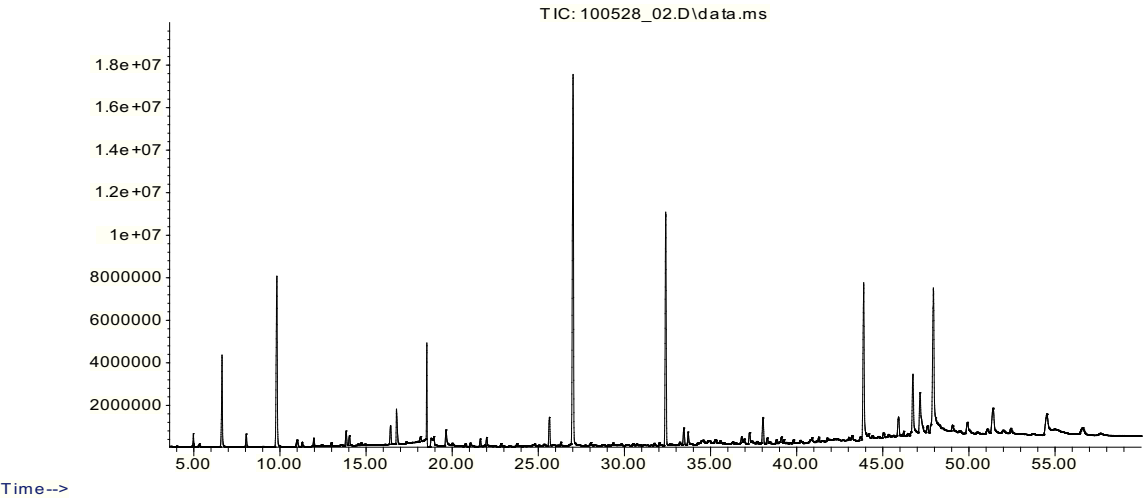


Abbildung 7.26: GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) der Biotransformation von unbehandeltem Weintresterpresskuchen durch *W. cocos* (Gewürztraminer,  $WCO_{WTu}$ , Kulturtag 6)

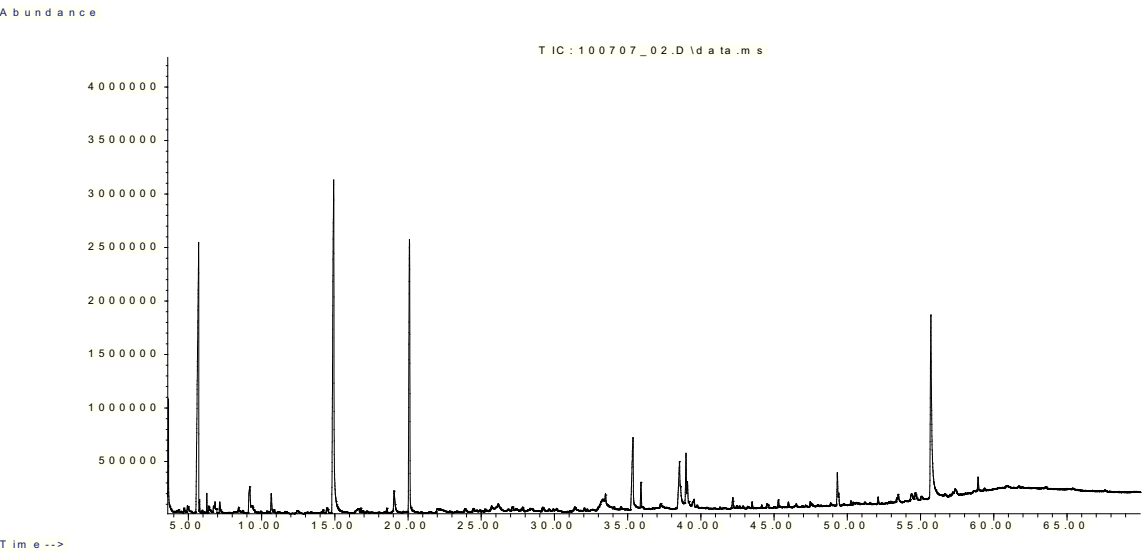


Abbildung 7.27: GC/MS-Chromatogramm (DB-5MS) der Biotransformation von unbehandeltem Weintresterpresskuchen durch *W. cocos* (Gewürztraminer,  $WCO_{WTU}$ , Kulturtag 6)

Tabelle 7.31: Massenspektren von Butan-2,3-diol ( $WCO_{WTU}$ , Kulturtag 6) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax) und einer unpolaren Säule (DB-5MS)

Butan-2,3-diol (HP-Innowax)

Butan-2,3-diol (DB-5MS)

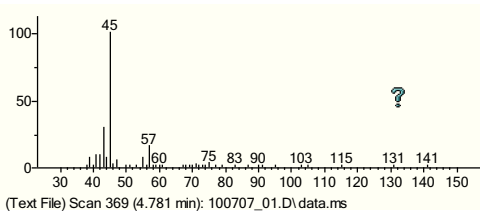
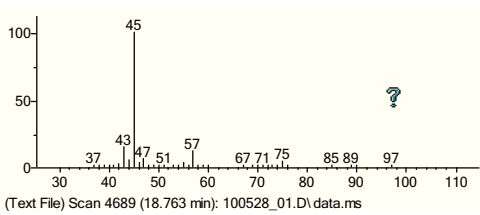


Tabelle 7.32: Massenspektren von 2-Methylbuttersäure ( $WCO_{WTU}$ , Kulturtag 6) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax) und einer unpolaren Säule (DB-5MS)

2-Methylbuttersäure (HP-Innowax)

2-Methylbuttersäure (DB-5MS)

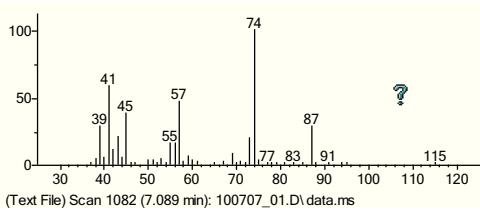
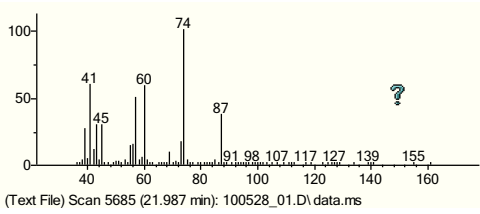
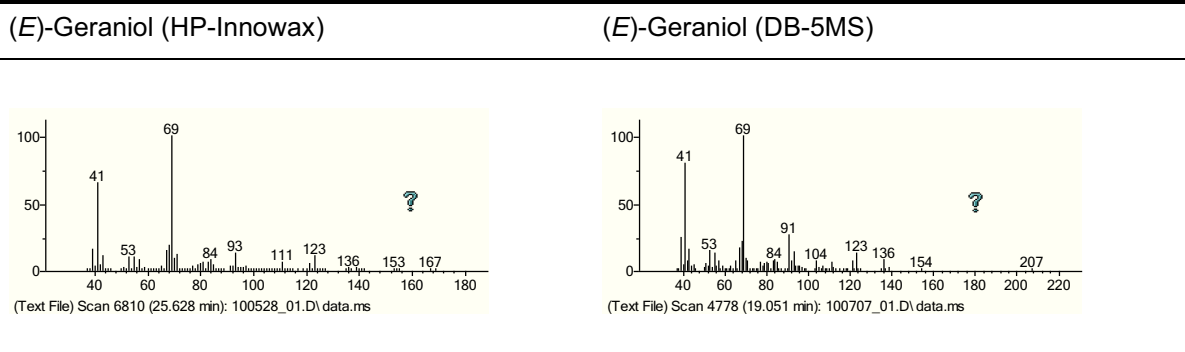


Tabelle 7.33: Massenspektren von (E)-Geraniol ( $WCO_{WTU}$ , Kulturtag 6) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax) und einer unpolaren Säule (DB-5MS)



### Optimierung der Medien

Im Folgenden werden nur Massenspektren der Substanzen aufgeführt, die noch nicht gezeigt wurden.

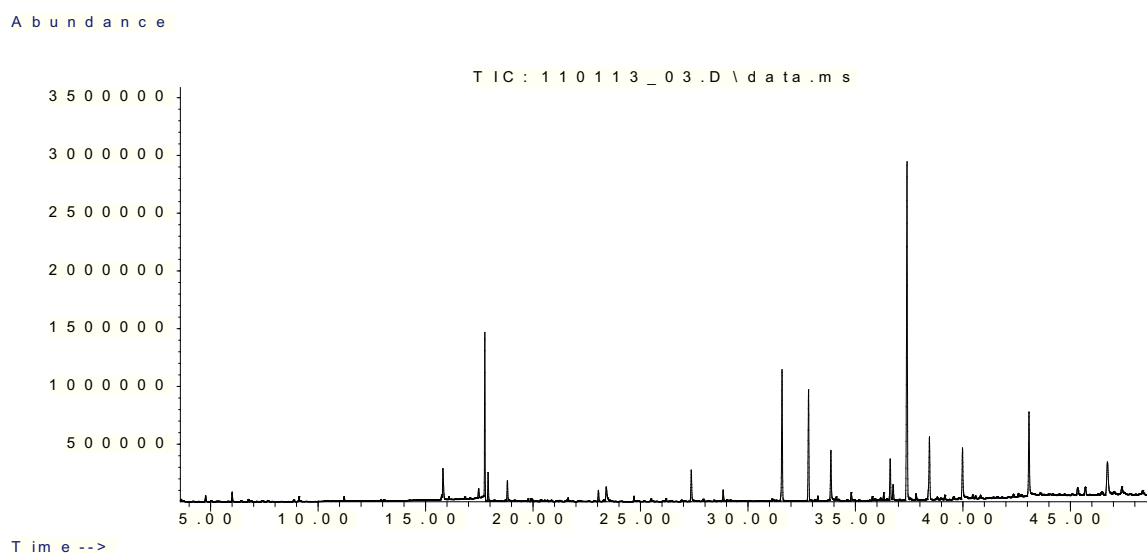


Abbildung 7.28: GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) der Biotransformation von unbehandeltem Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer) durch *T. chioneus* ( $TCH_{WTU}$ , Kulturtag 4) im Medium M7 nur in suspendiertem Substrat

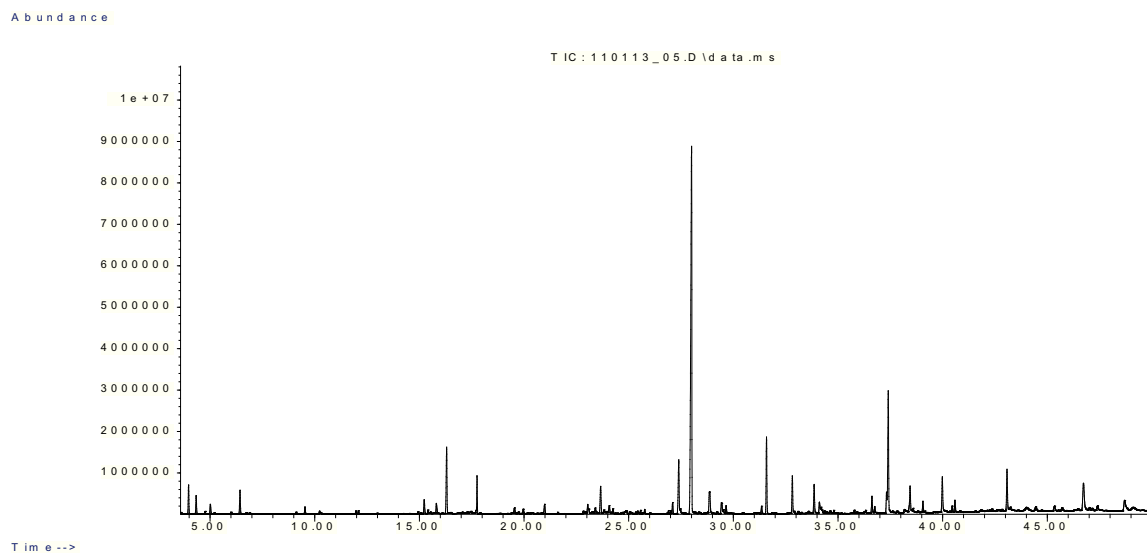


Abbildung 7.29: GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) der Biotransformation von unbehandeltem Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer) durch *T. chioneus* ( $TCH_{WTU}$ , Kulturtag 4) im Medium M6 ohne Aspartat

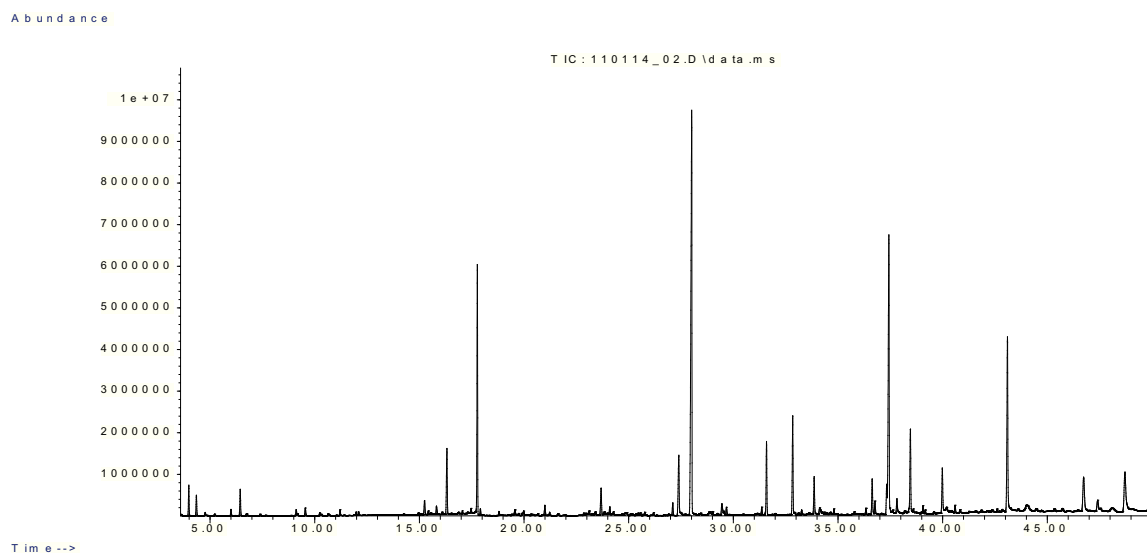


Abbildung 7.30: GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) der Biotransformation von unbehandeltem Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer) durch *T. chioneus* ( $TCH_{WTU}$ , Kulturtag 4) im Medium M4 ohne BME-Vitaminlösung



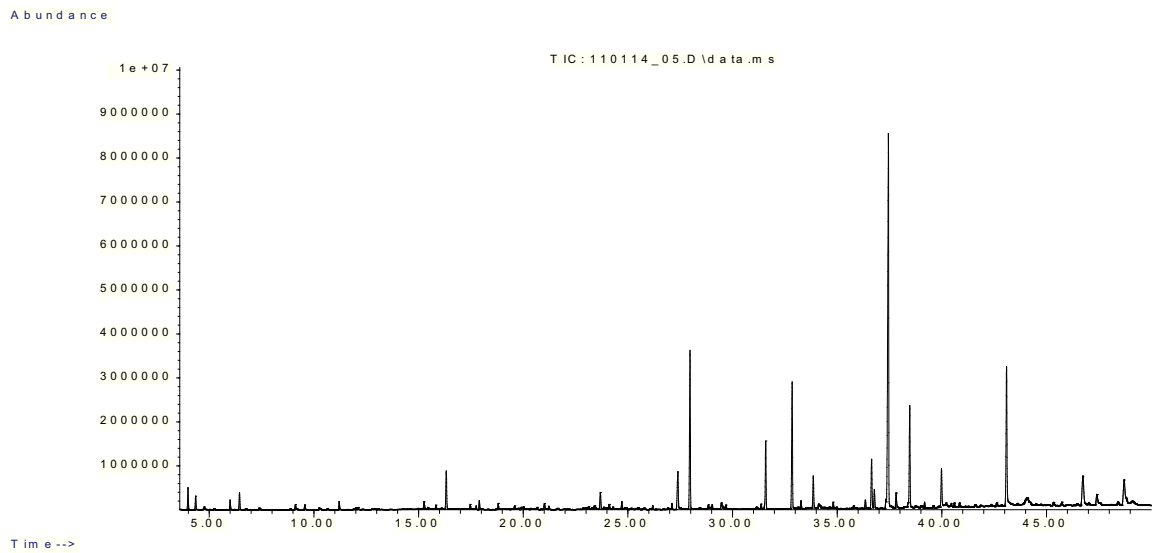


Abbildung 7.31: GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) der Biotransformation von unbehandeltem Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer) durch *T. chioneus* ( $TCH_{WTu}$ , Kulturtag 4) im Medium M3 ohne Spurenelementlösung

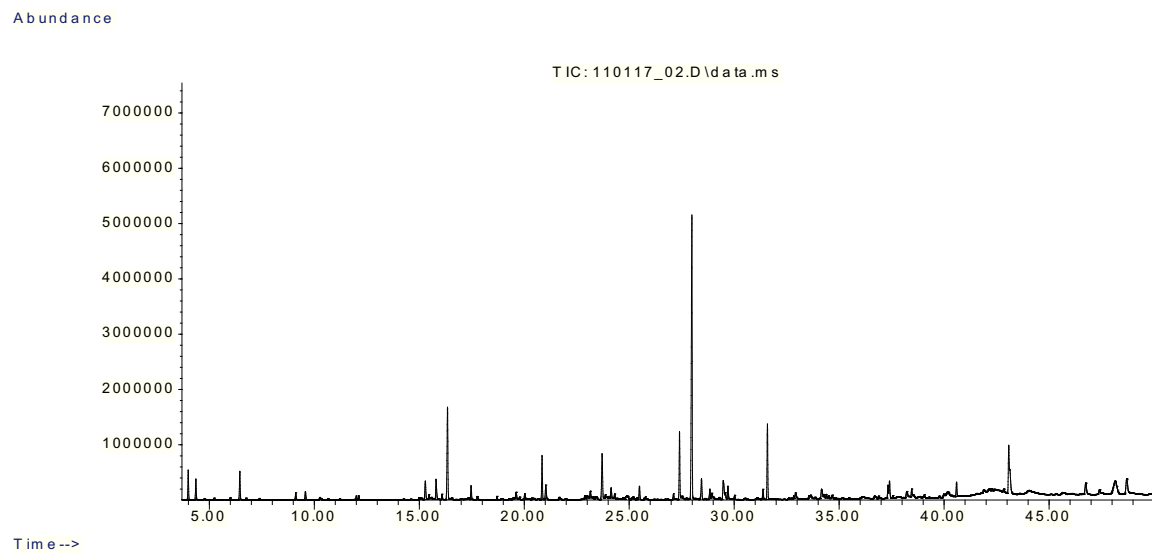


Abbildung 7.32: GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) der Biotransformation von unbehandeltem Apfeltrester durch *T. chioneus* ( $TCH_{ATu}$ , Kulturtag 4) im Medium M2

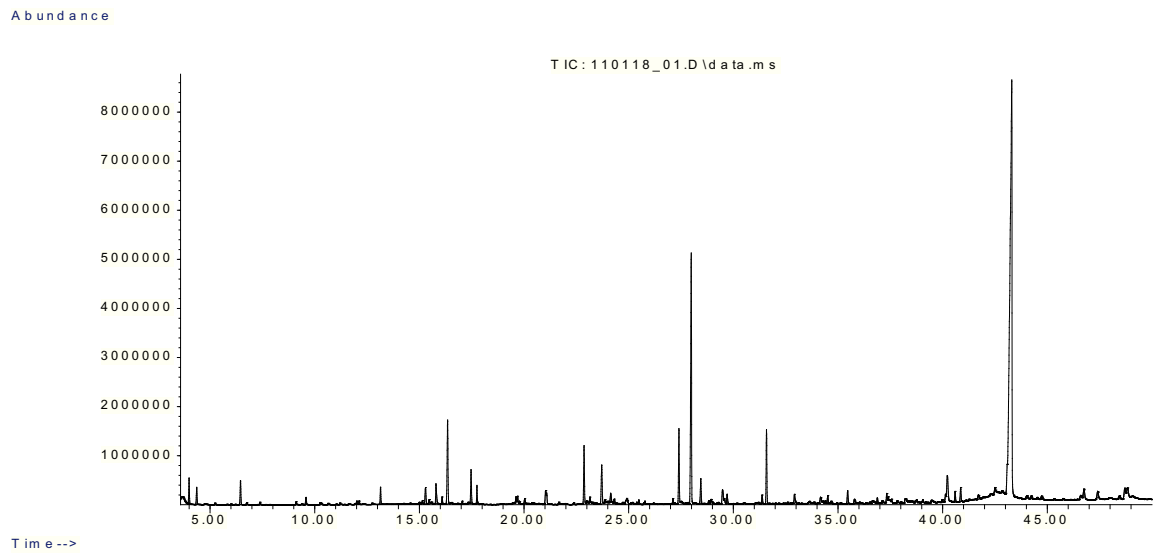


Abbildung 7.33: GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) des Blindwertes von unbehandeltem Apfeltrester ( $ATu_{BW}$ , Kulturtag 4) im Medium M2

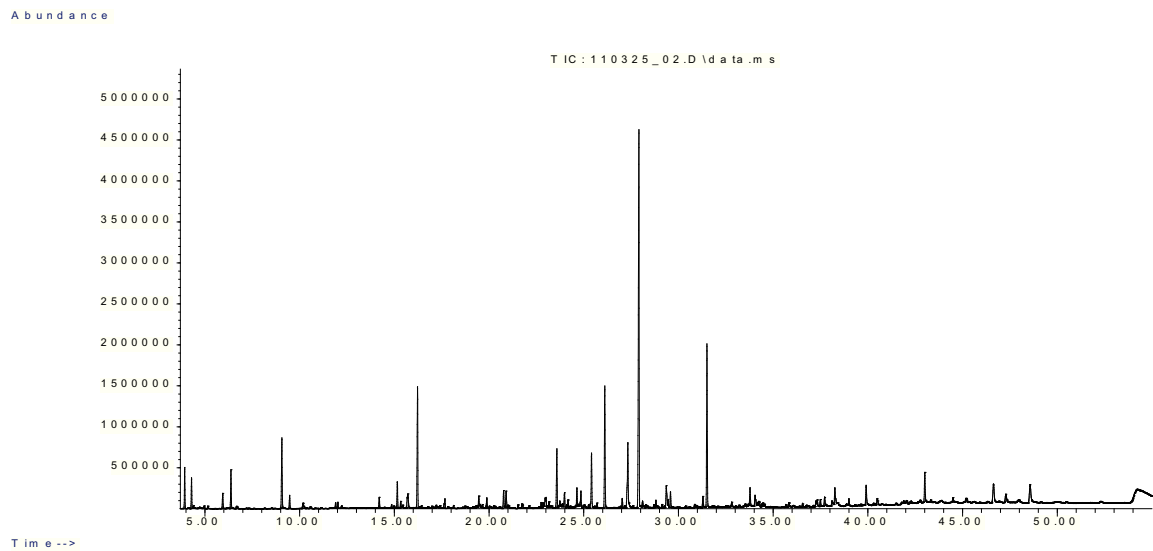


Abbildung 7.34: GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) der Biotransformation von Weintrester (Gewürztraminer) aus Gengenbach durch *W. cocos* ( $WCO_{WTg}$ , Kulturtag 6) im Medium M2

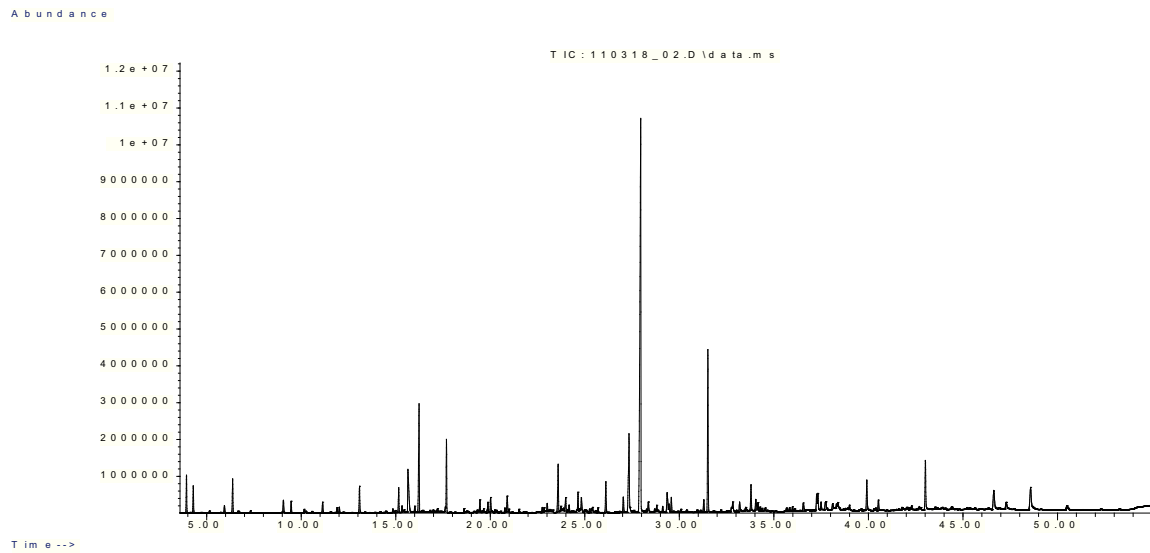


Abbildung 7.35: GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) des Blindwertes von Weintrester (Gewürztraminer) aus Gengenbach (WT<sub>GB</sub>, Kulturtag 6) im Medium M2

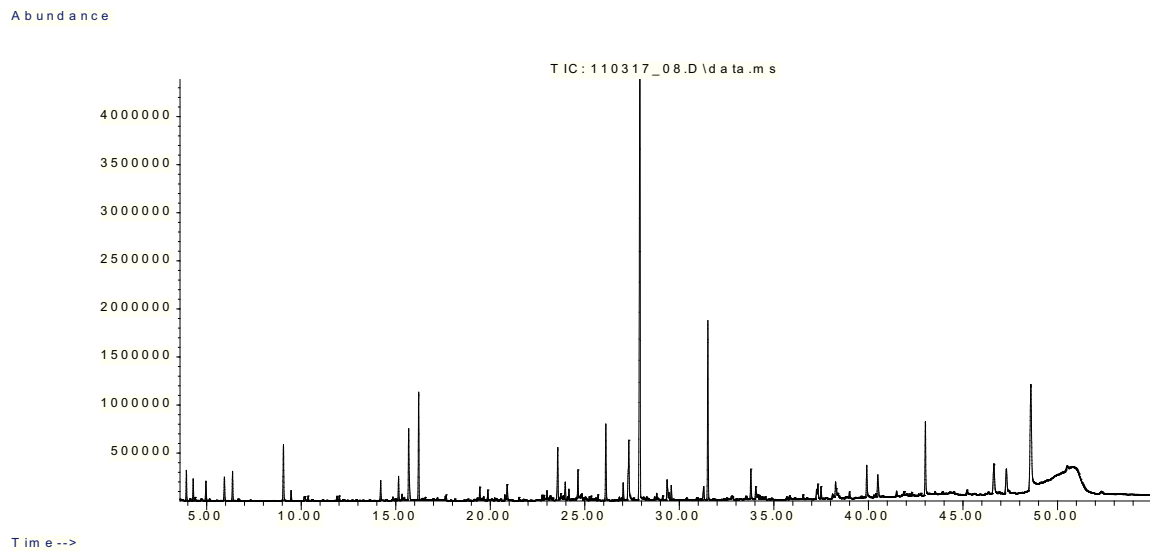


Abbildung 7.36: GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) der Biotransformation von unbehandeltem Weintrester (Gewürztraminer) aus Gengenbach durch *W. cocos* (WCO<sub>WTgu</sub>, Kulturtag 6) im Medium M2

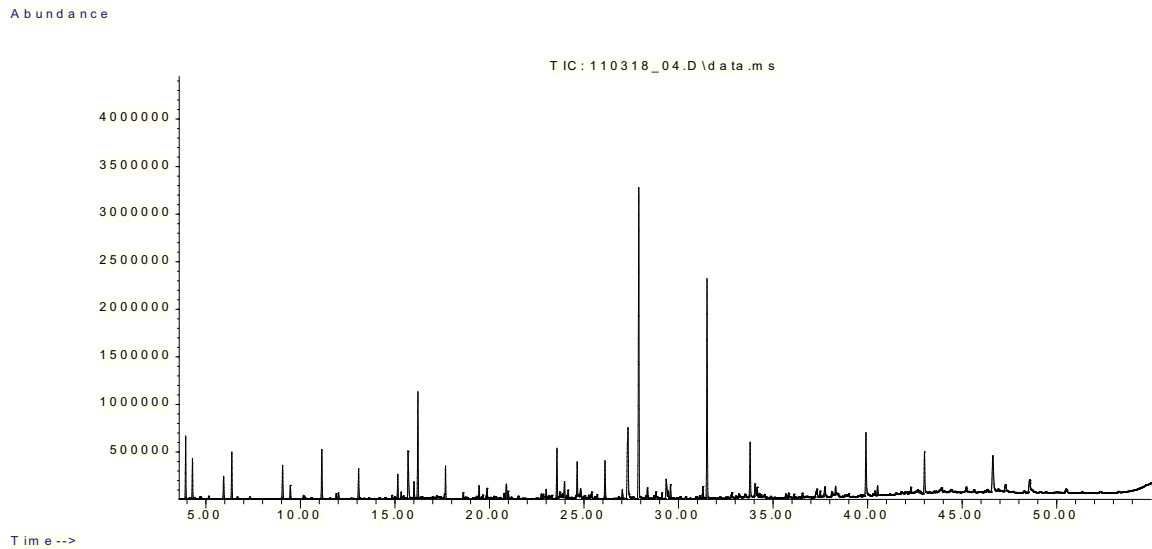


Abbildung 7.37: GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) des Blindwertes von unbehandeltem Weintrester (Gewürztraminer) aus Gengenbach (WTgu<sub>BW</sub>, Kulturtag 6) im Medium M2

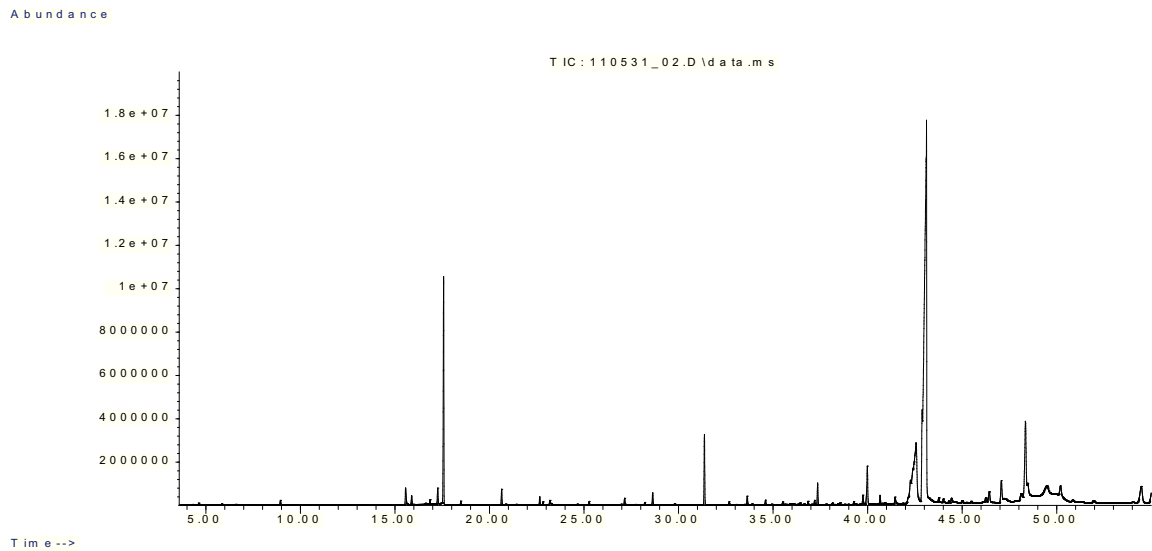


Abbildung 7.38: GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) der Biotransformation von lyophilisiertem Apfeltrester durch *T. chioneus* (TCH<sub>AT</sub>, Kulturtag 4) im Medium M5 ohne zusätzliche Stickstoffquelle

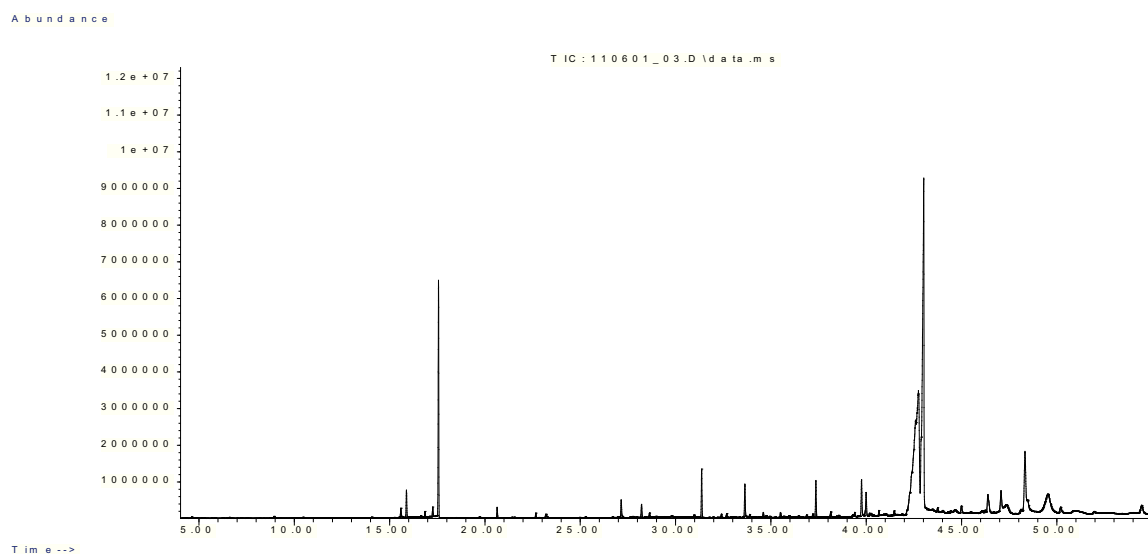


Abbildung 7.39: GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) der Biotransformation von lyophilisiertem Apfeltrester durch *T. chioneus* ( $TCH_{AT}$ , Kulturtag 4) im Medium M3 ohne Spurenelementlösung

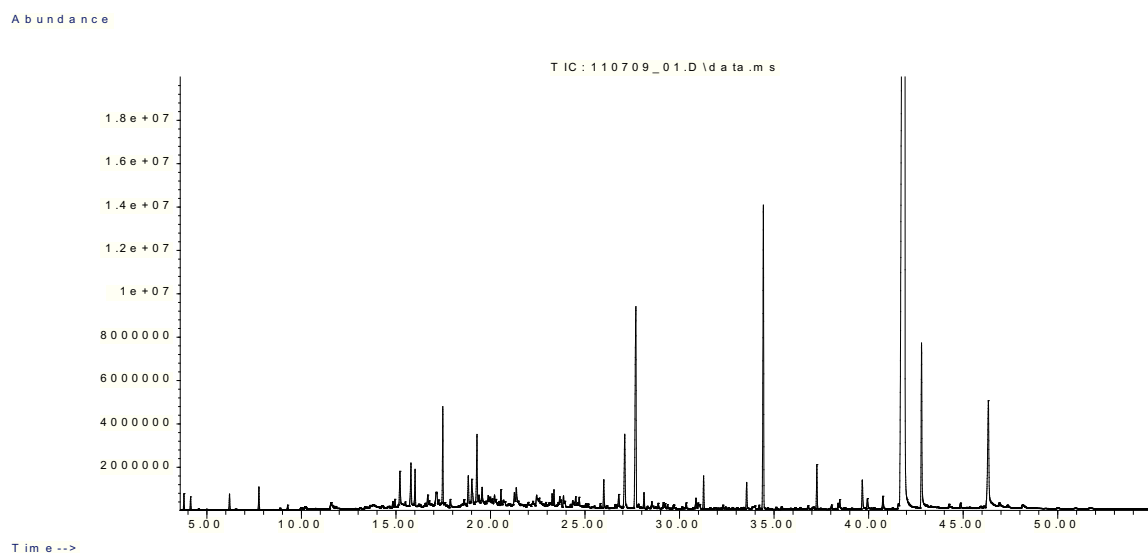


Abbildung 7.40: GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) der Biotransformation von unbehandeltem Apfeltrester durch *T. chioneus* ( $TCH_{ATU}$ , Kulturtag 4) im Medium M8 mit Supplementation von Glucose

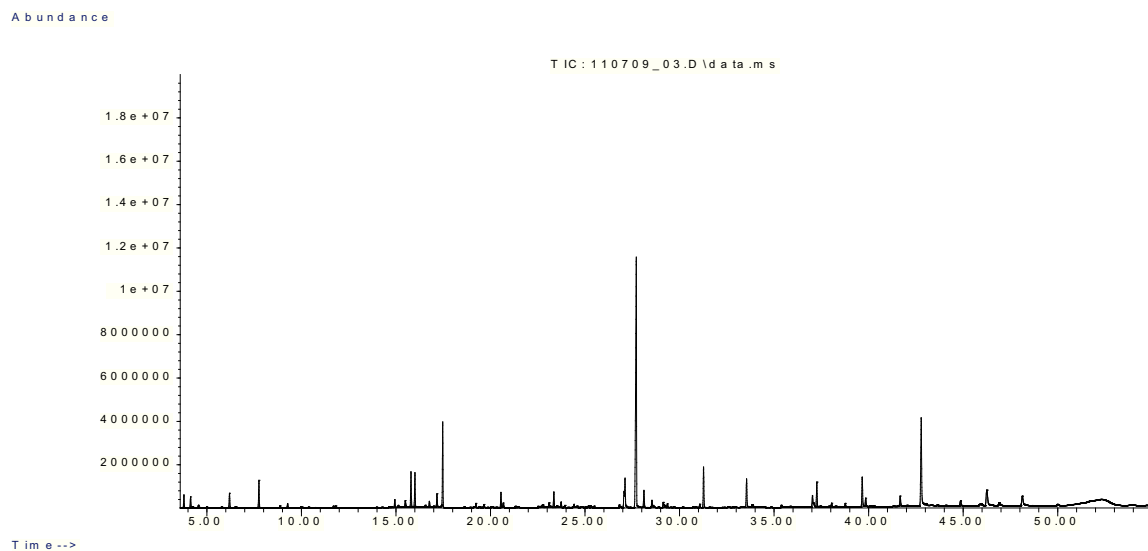


Abbildung 7.41: GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) der Biotransformation von unbehandeltem Apfeltrester durch *T. chioneus* ( $TCH_{ATu}$ , Kulturtag 4) im Medium M13 mit reduzierter Gabe von BME-Vitaminlösung und Spurenelementlösung

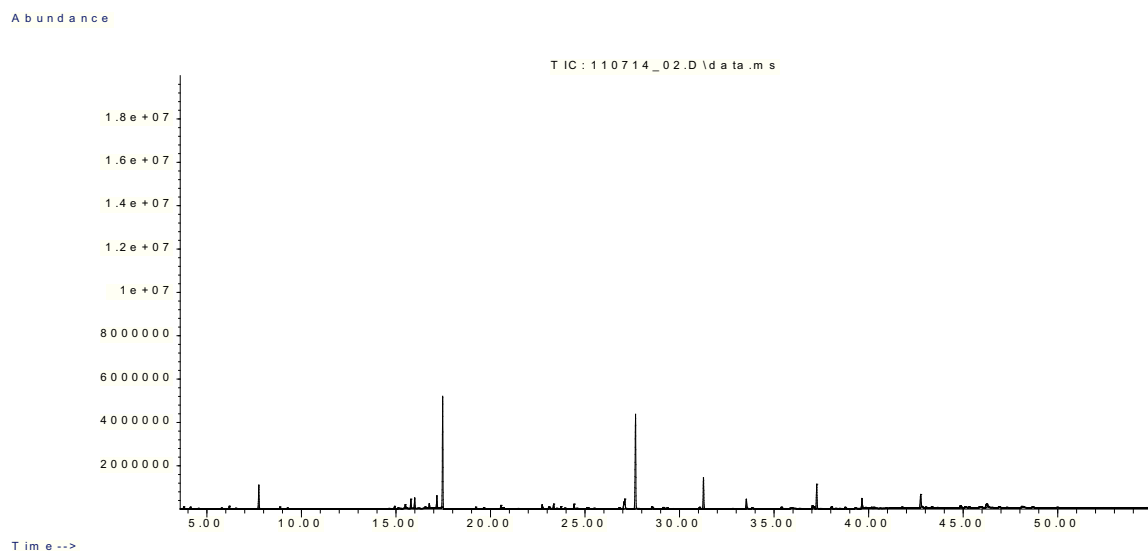


Abbildung 7.42: GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) der Biotransformation von unbehandeltem Apfeltrester durch *T. chioneus* ( $TCH_{ATu}$ , Kulturtag 4) im Medium M5 ohne Stickstoffquelle

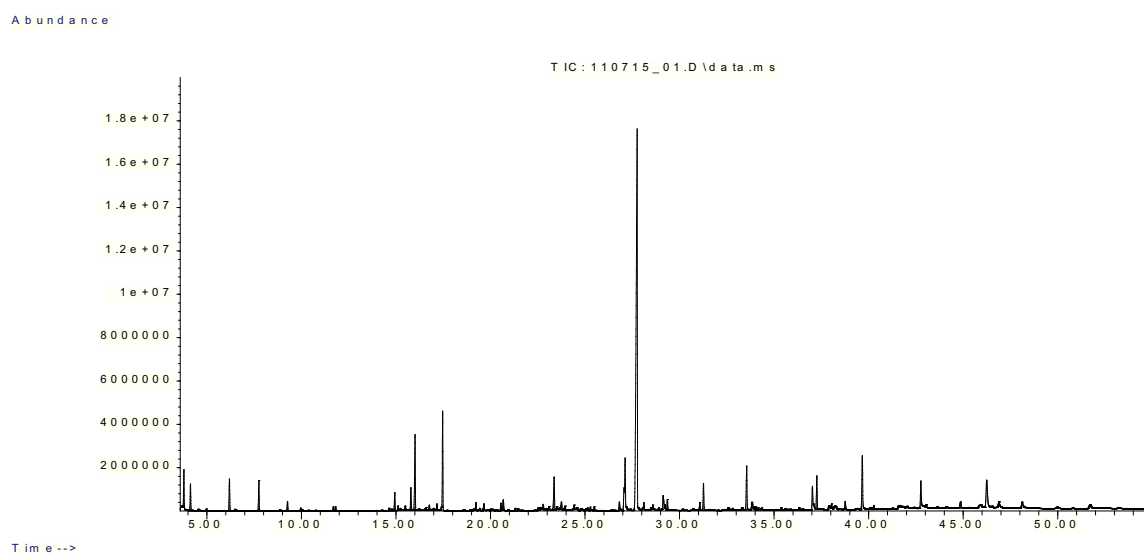


Abbildung 7.43: GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) der Biotransformation von unbehandeltem Apfeltrester durch *T. chioneus* ( $TCH_{ATu}$ , Kulturtag 4) im Medium M4 ohne BME-Vitaminlösung

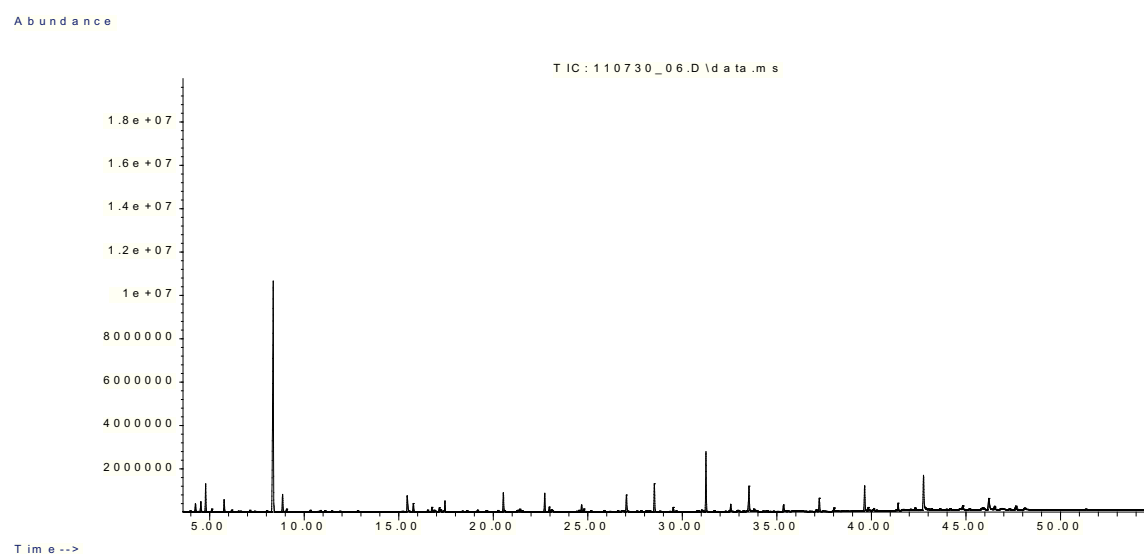


Abbildung 7.44: GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) der Biotransformation von unbehandeltem Apfeltrester durch *T. chioneus* ( $TCH_{ATu}$ , Kulturtag 4) im Medium M12 mit Hefeextrakt

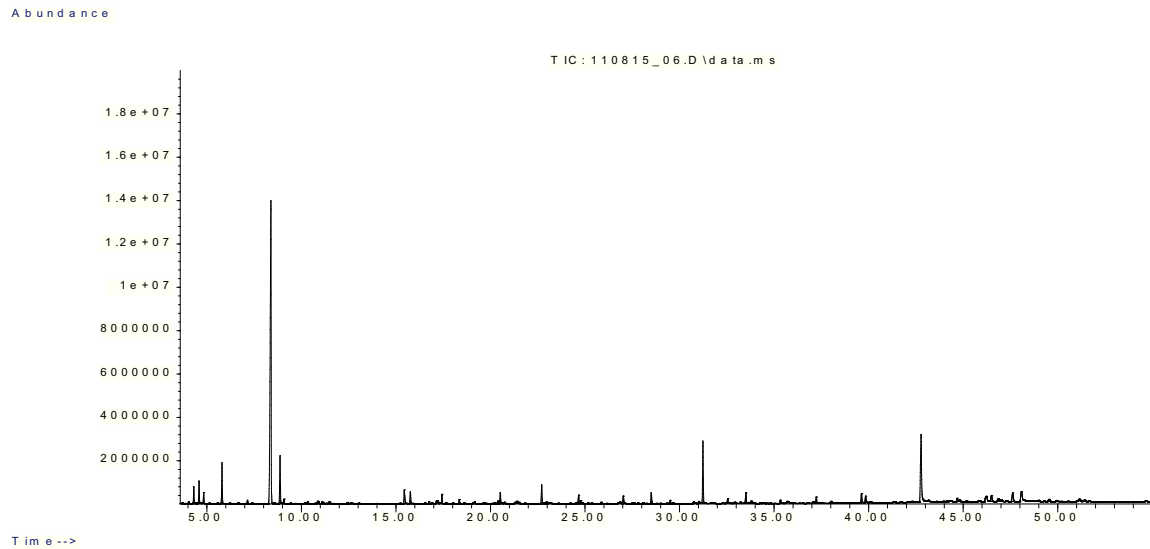


Abbildung 7.45: GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) der Biotransformation von unbehandeltem Apfeltrester durch *T. chioneus* ( $TCH_{ATu}$ , Kulturtag 4) im Medium M15 mit Sojapepton

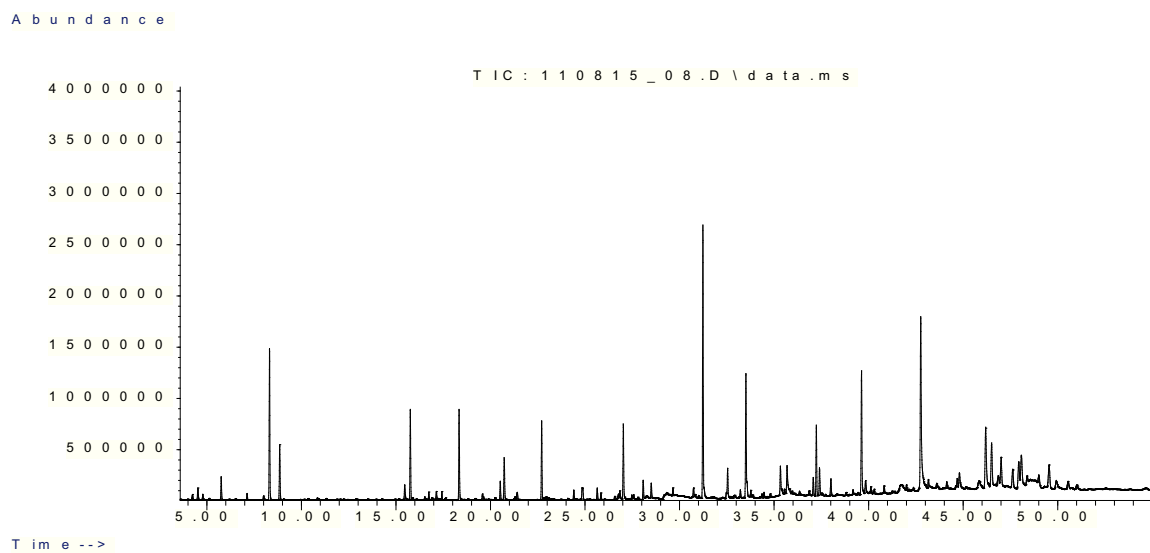


Abbildung 7.46: GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) der Biotransformation von unbehandeltem Apfeltrester durch *T. chioneus* ( $TCH_{ATu}$ , Kulturtag 4) im Medium M16 mit Casein-Hydrolysat



## Supplementierung des Nährmediums

Im Folgenden werden nur Massenspektren der Substanzen aufgeführt, die noch nicht gezeigt wurden.

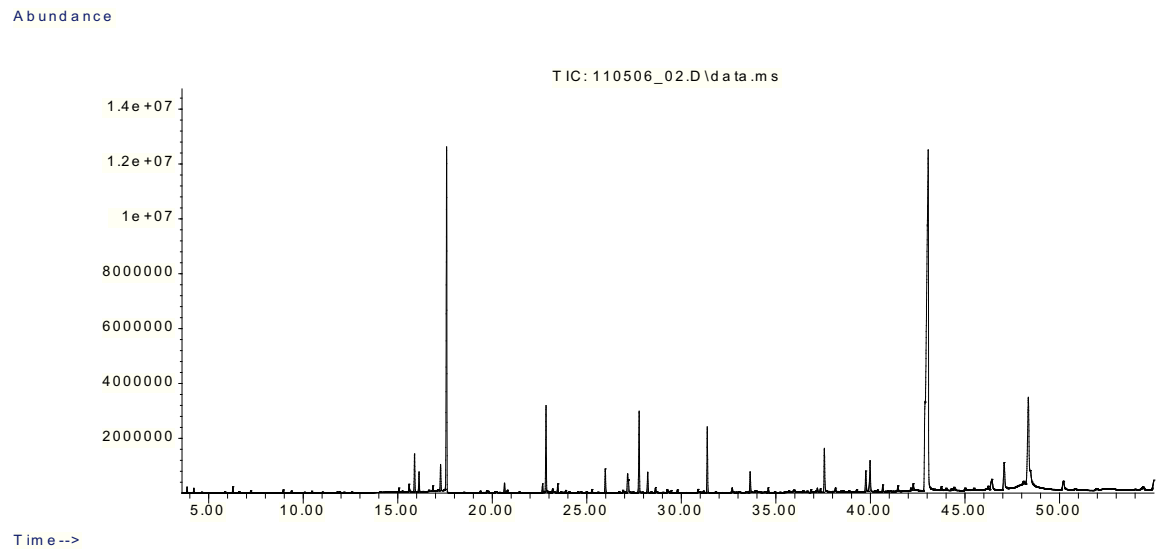


Abbildung 7.47: GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) der Biotransformation von lyophilisiertem Apfeltrester durch *T. chioneus* ( $TCH_{AT}$ , Kulturtag 4) im Medium M8 supplementiert mit *L*-Phenylalanin

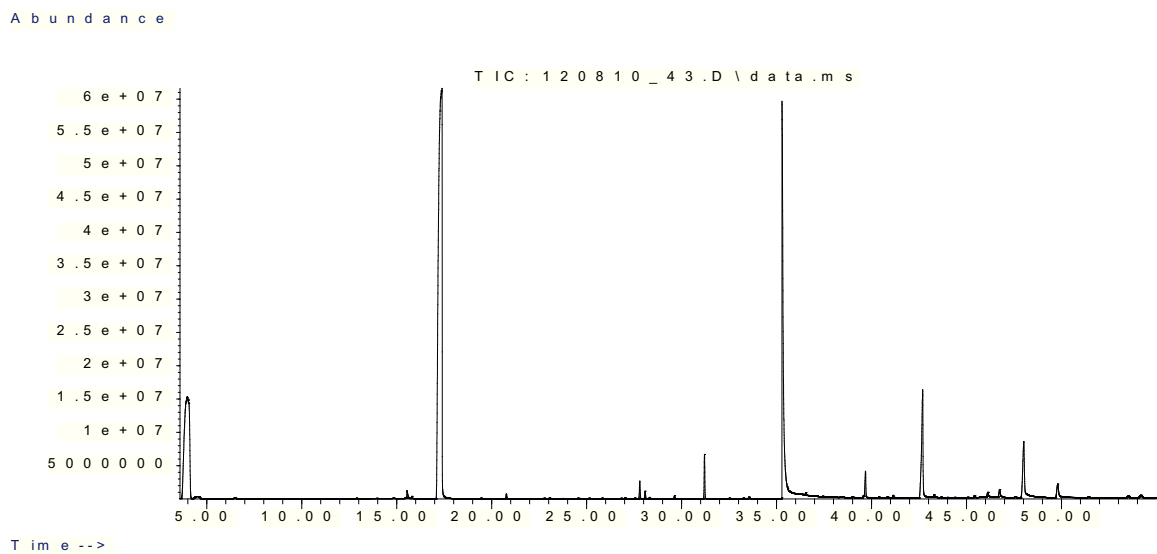


Abbildung 7.48: GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) der Biotransformation von lyophilisiertem Apfeltrester durch *T. chioneus* ( $TCH_{AT}$ , Kulturtag 4) im Medium M19 supplementiert mit Benzaldehyd

Tabelle 7.34: Massenspektren von Benzoesäure und 2-Hydroxybenzaldehyd ( $TCH_{ATu\ M19}$ , Kulturtag 4) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)

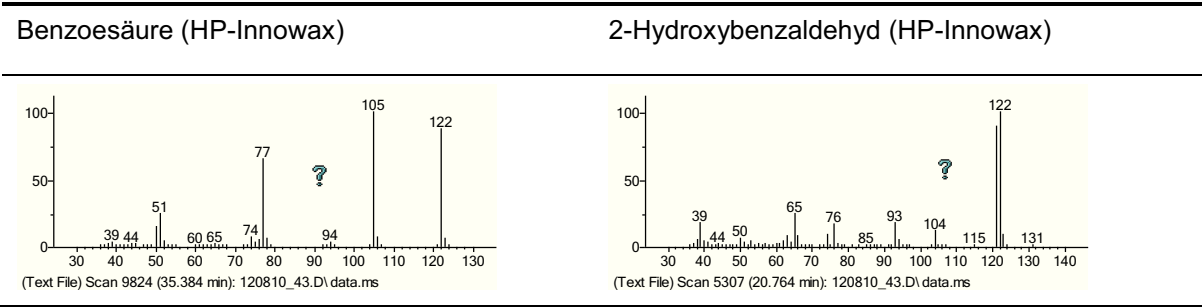
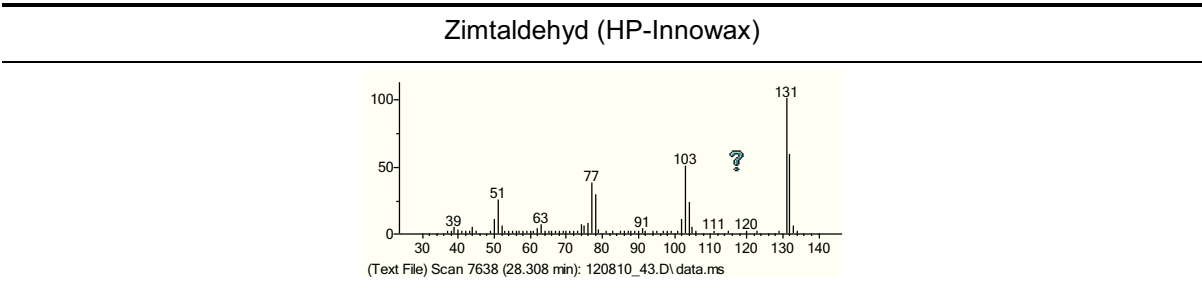


Tabelle 7.35: Massenspektrum von Zimtaldehyd ( $TCH_{ATu\ M19}$ , Kulturtag 4) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)



Abundance

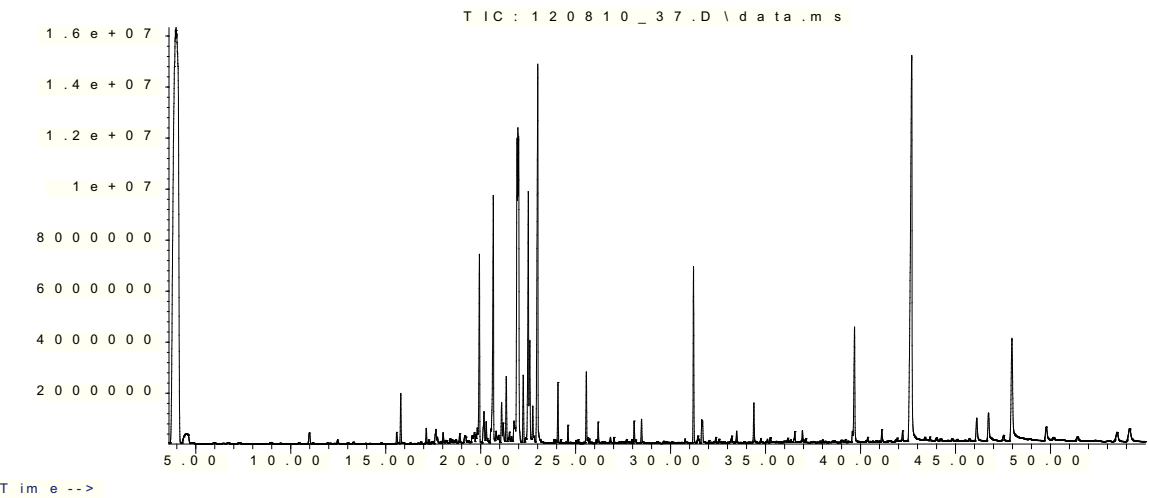


Abbildung 7.49: GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) der Biotransformation von lyophilisiertem Apfeltrester durch *T. chioneus* ( $TCH_{AT}$ , Kulturtag 4) im Medium M20 supplementiert mit  $\alpha$ -Farnesen

Tabelle 7.36: Massenspektren von  $\tau$ -Cadinol und  $\alpha$ -Bisabolol ( $TCH_{AT\ M20}$ , Kulturtag 4) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)

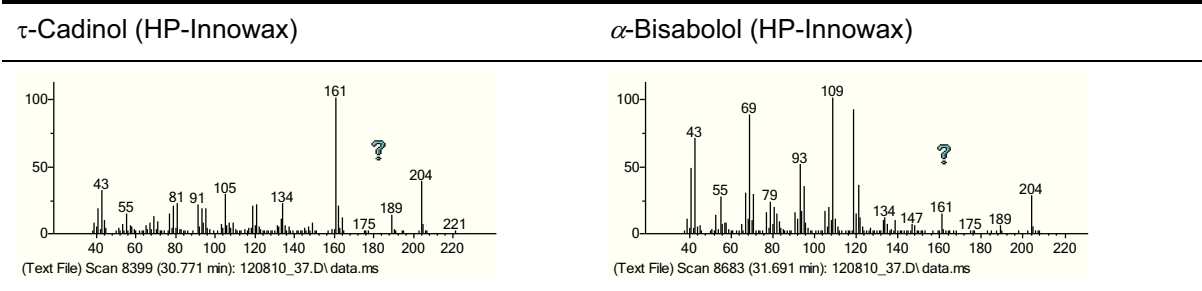


Tabelle 7.37: Massenspektrum von 6-Methyl-5-hepten-2-on  $TCH_{AT\ M20}$ , Kulturtag 4) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)

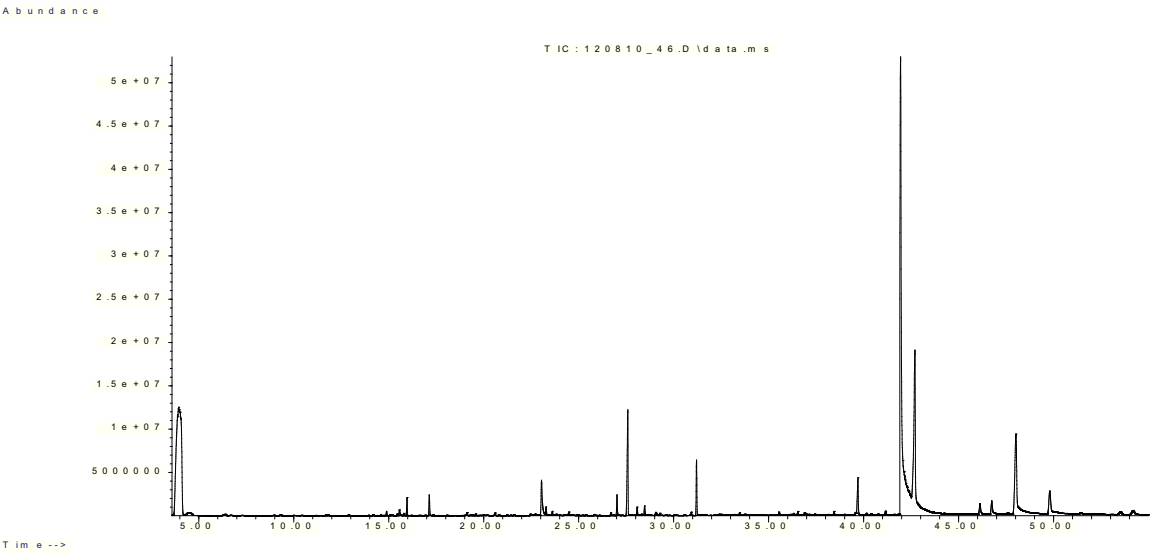
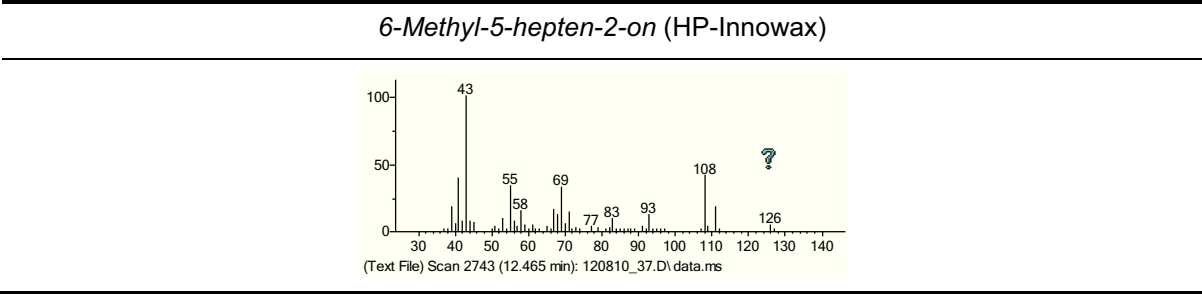
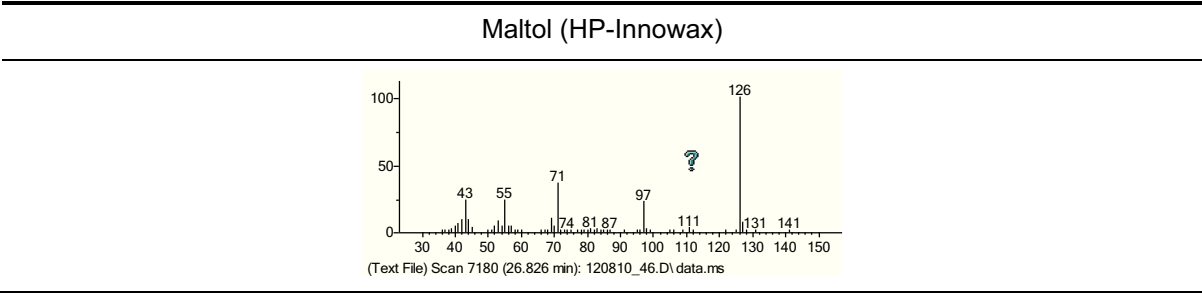


Abbildung 7.50: GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) der Biotransformation von lyophilisiertem Apfeltrester durch *T. chioneus* ( $TCH_{AT}$ , Kulturtag 4) im Medium M24 supplementiert mit Zimtsäure

Tabelle 7.38: Massenspektrum von Maltol ( $TCH_{AT\ M24}$ , Kulturtag 4) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)



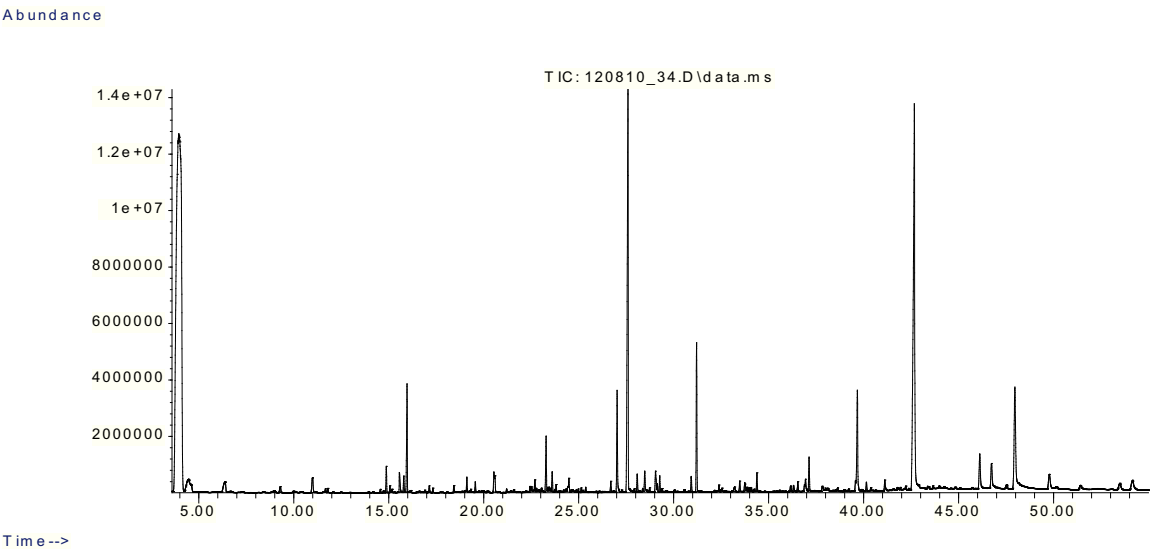
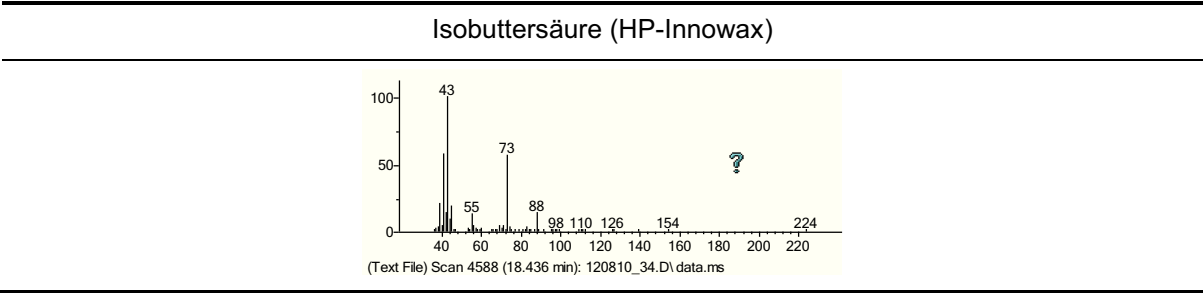


Abbildung 7.51: GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) der Biotransformation von lyophilisiertem Apfeltrester durch *T. chioneus* ( $TCH_{AT}$ , Kulturtag 4) im Medium M21 supplementiert mit Kaffeesäure

Tabelle 7.39: Massenspektrum von Isobuttersäure ( $TCH_{AT}$  M21, Kulturtag 4) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)



### Bildung flüchtiger Verbindungen im Kulturverlauf von *W. cocos* mit dem Substrat unbehandelter Weintrester

Im Folgenden werden nur Massenspektren der Substanzen aufgeführt, die noch nicht gezeigt wurden.

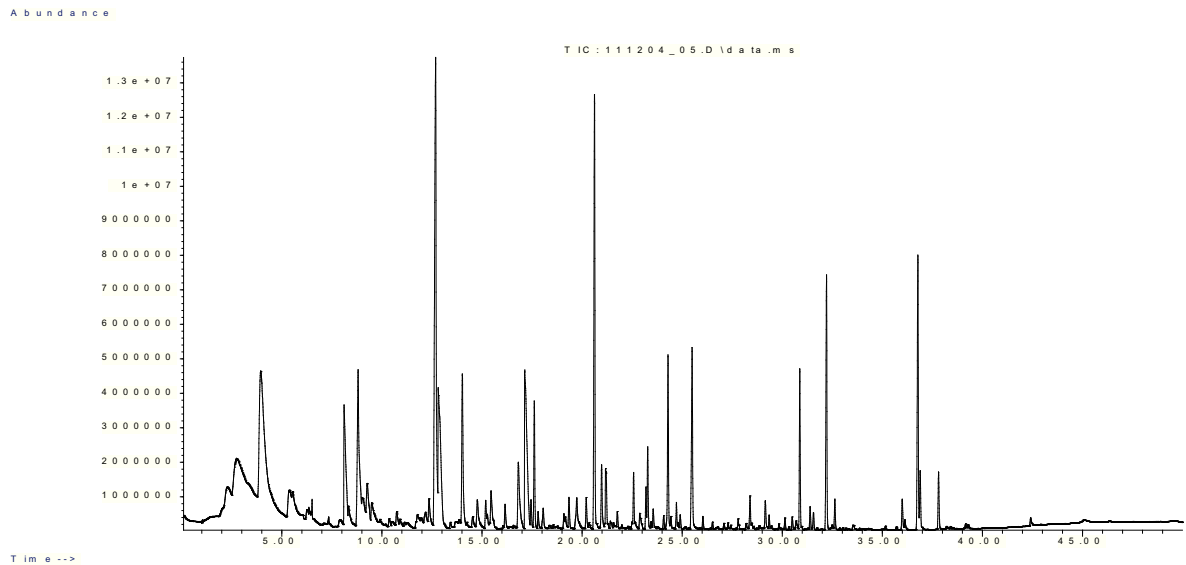


Abbildung 7.52: GC/MS-Chromatogramm der HS-SPME-Extraktion der Kultivierung von *W. cocos* mit unbehandeltem Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer, Kulturtag 0) (n=3)

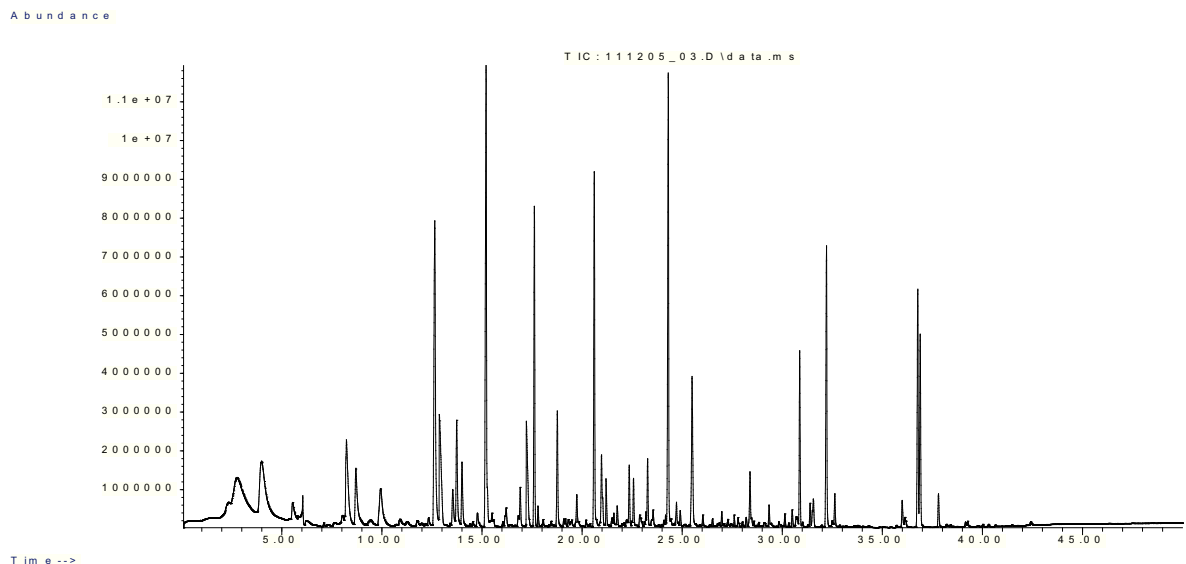


Abbildung 7.53: GC/MS-Chromatogramm der HS-SPME-Extraktion der Kultivierung von *W. cocos* mit unbehandeltem Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer, Kulturtag 1) (n=4)

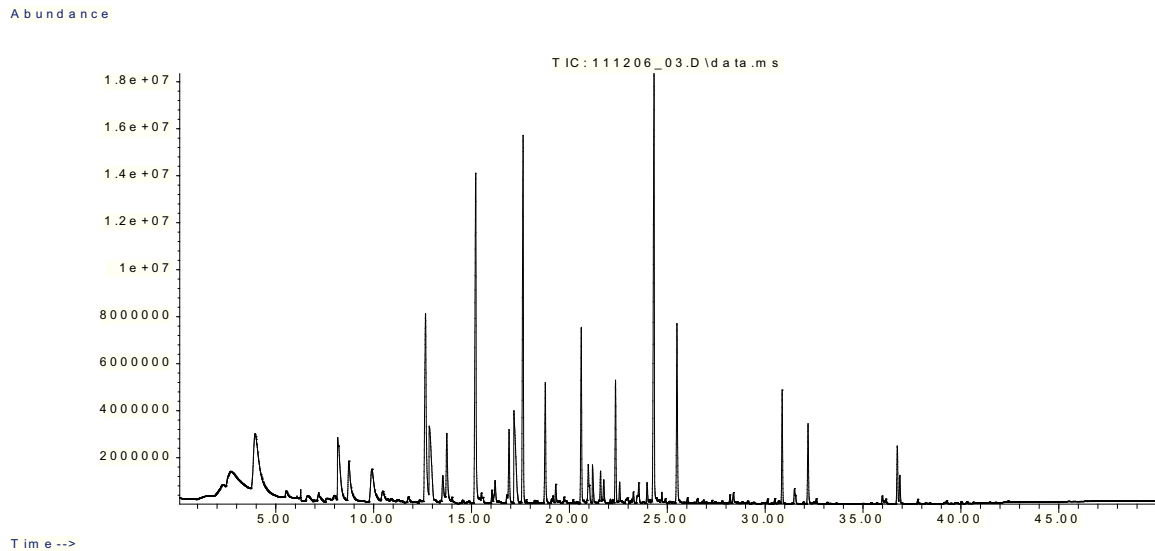


Abbildung 7.54: GC/MS-Chromatogramm der HS-SPME-Extraktion der Kultivierung von *W. cocos* mit unbehandeltem Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer, Kulturtag 2) (n=4)

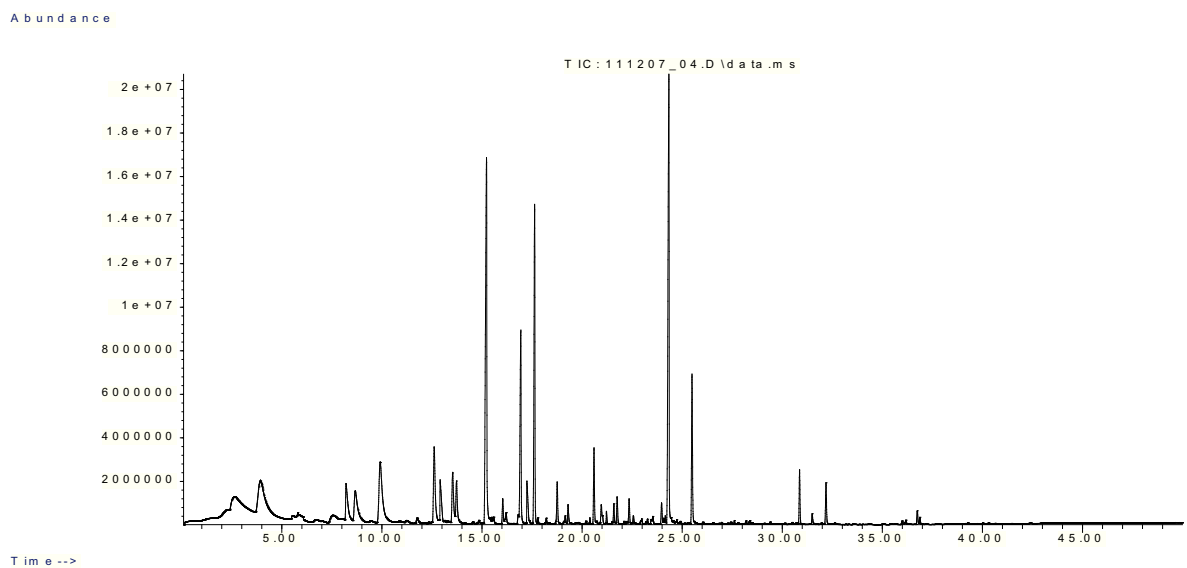


Abbildung 7.55: GC/MS-Chromatogramm der HS-SPME-Extraktion der Kultivierung von *W. cocos* mit unbehandeltem Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer, Kulturtag 3) (n=4)

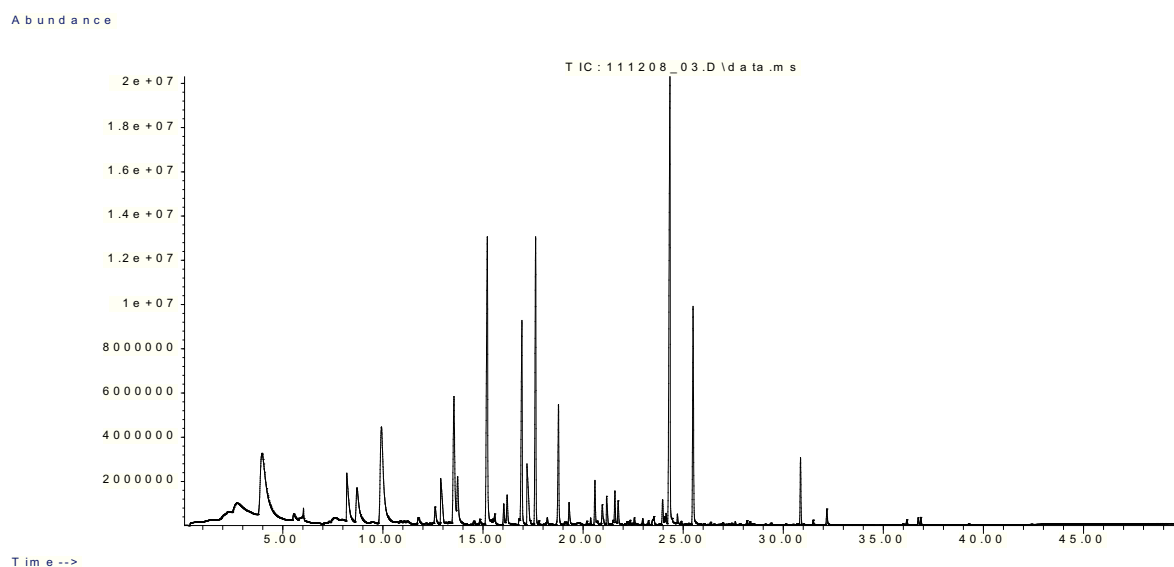


Abbildung 7.56: GC/MS-Chromatogramm der HS-SPME-Extraktion der Kultivierung von *W. cocos* mit unbehandeltem Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer, Kulturtag 4) ( $n=4$ )

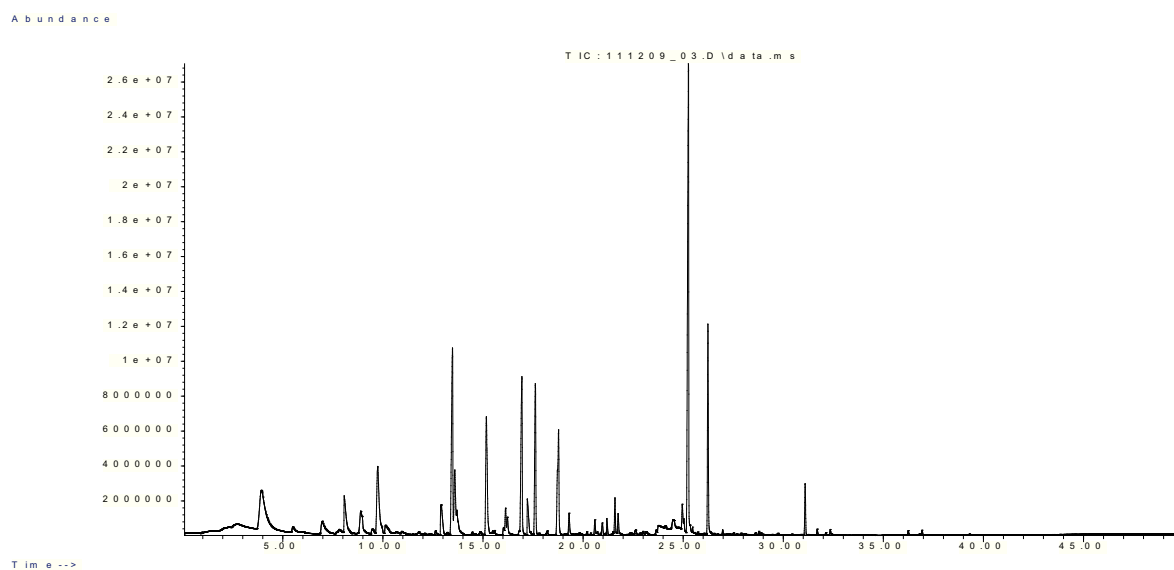


Abbildung 7.57: GC/MS-Chromatogramm der HS-SPME-Extraktion der Kultivierung von *W. cocos* mit unbehandeltem Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer, Kulturtag 5) ( $n=4$ )

Abundance

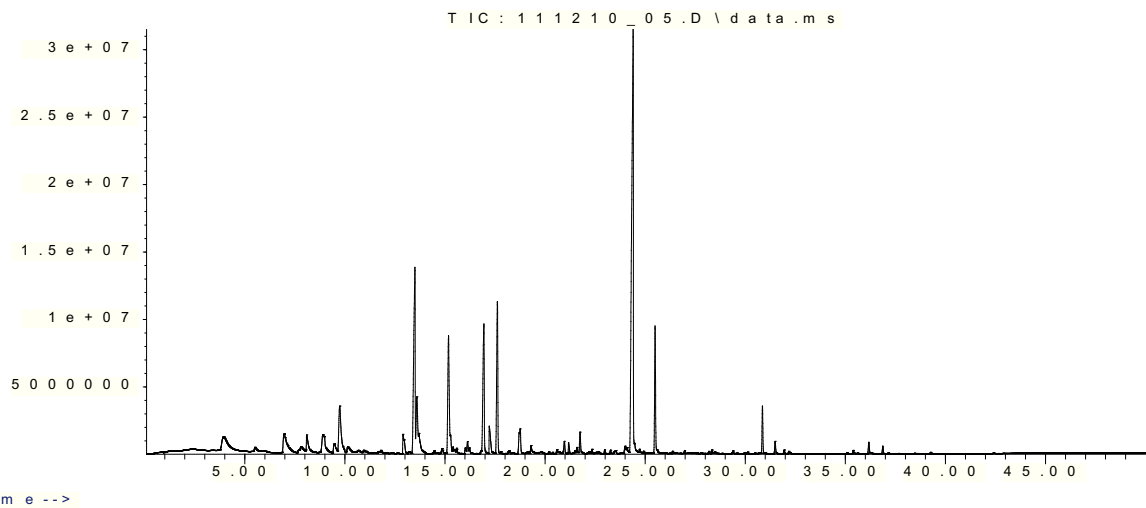


Abbildung 7.58: GC/MS-Chromatogramm der HS-SPME-Extraktion der Kultivierung von *W. cocos* mit unbehandeltem Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer, Kulturtag 6) ( $n=4$ )

Abundance

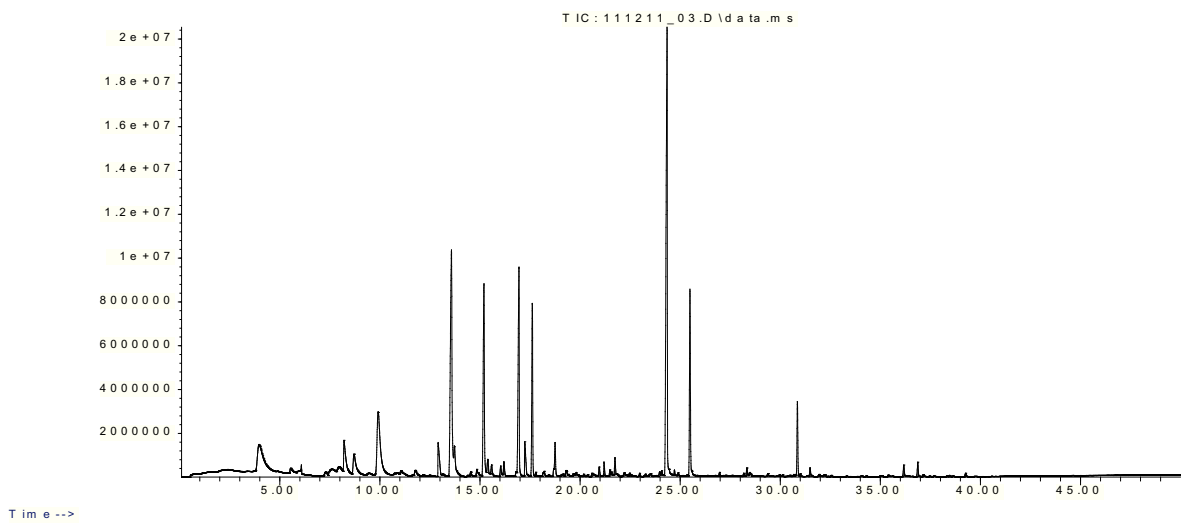


Abbildung 7.59: GC/MS-Chromatogramm der HS-SPME-Extraktion der Kultivierung von *W. cocos* mit unbehandeltem Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer, Kulturtag 7) ( $n=3$ )



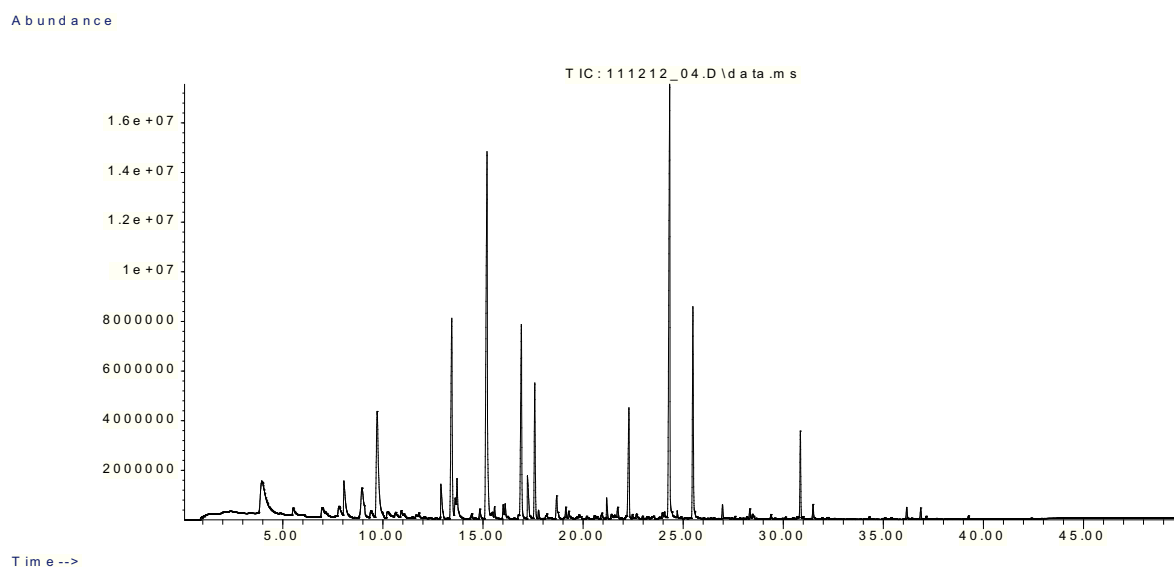


Abbildung 7.60: GC/MS-Chromatogramm der HS-SPME-Extraktion der Kultivierung von *W. cocos* mit unbehandeltem Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer, Kulturtag 8) ( $n=4$ )

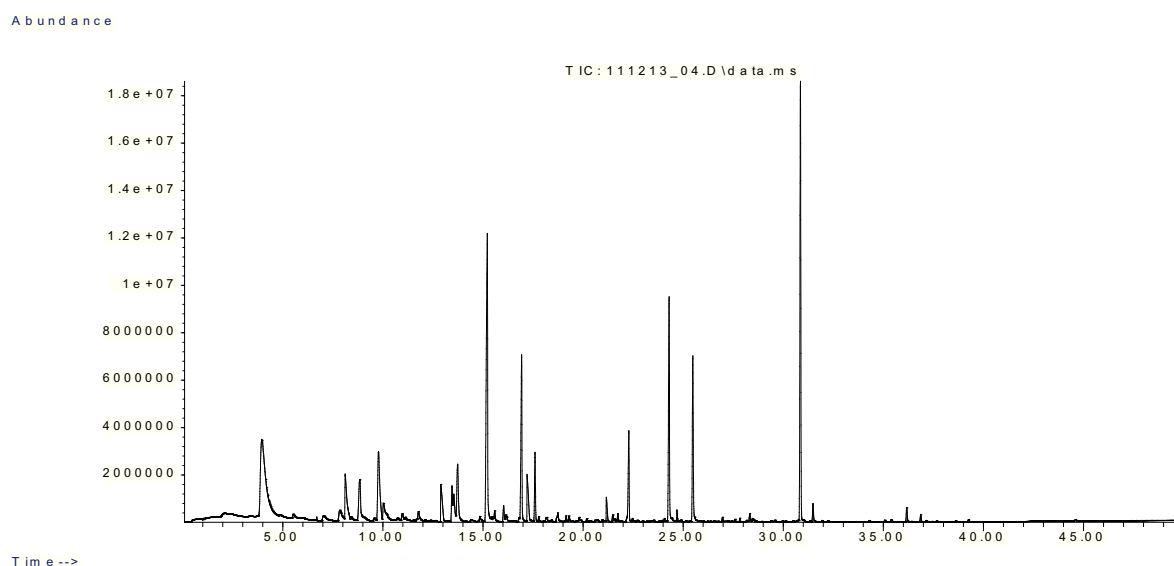


Abbildung 7.61: GC/MS-Chromatogramm der HS-SPME-Extraktion der Kultivierung von *W. cocos* mit unbehandeltem Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer, Kulturtag 9) ( $n=4$ )

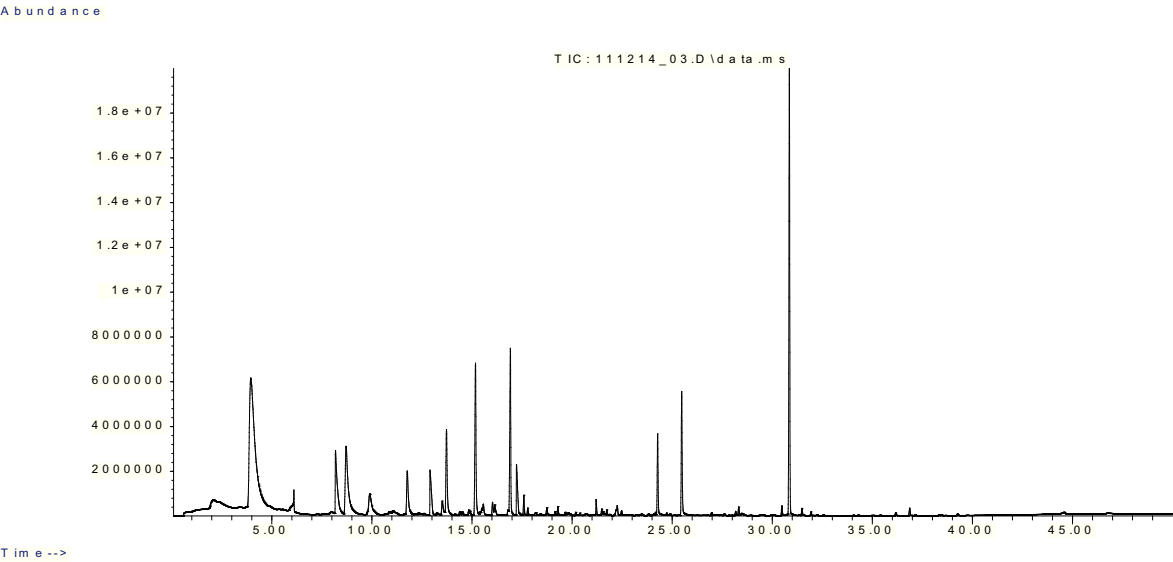


Abbildung 7.62: GC/MS-Chromatogramm der HS-SPME-Extraktion der Kultivierung von *W. cocos* mit unbehandeltem Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer, Kulturtag 10) (n=4)

Tabelle 7.40: Massenspektren von Hexan-1-ol und 2-Hexen-1-ol ( $WCO_{WTu}$  Kinetik) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)

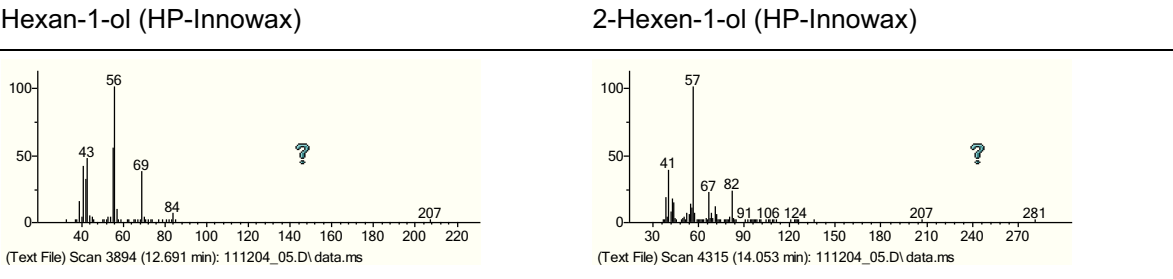


Tabelle 7.41: Massenspektren von Nonan-2-ol und (Z)-Geraniol ( $WTu_{WCO}$  Kinetik) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)

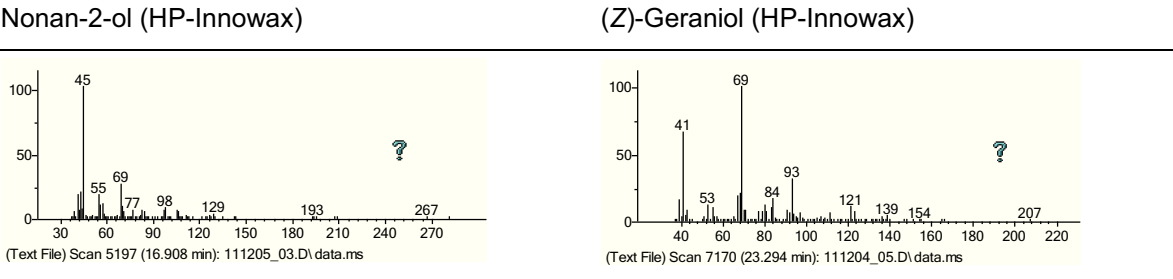
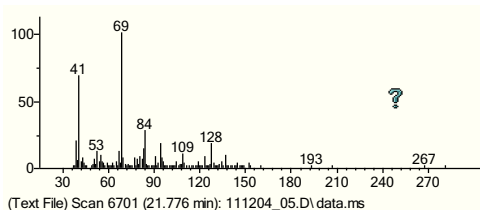


Tabelle 7.42: Massenspektren von Citral und Citronellol ( $WTu_{WCO}$  Kinetik) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)

## Citral (HP-Innowax)



## Citronellol (HP-Innowax)

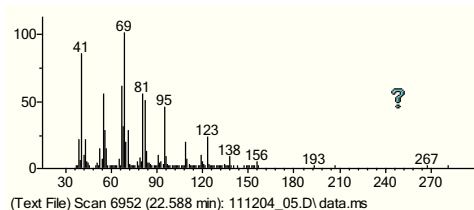
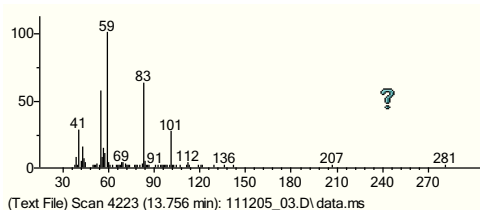


Tabelle 7.43: Massenspektren von Octan-3-ol und Octan-3-on ( $WTu_{WCO}$  Kinetik) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)

## Octan-3-ol (HP-Innowax)



## Octan-3-on (HP-Innowax)

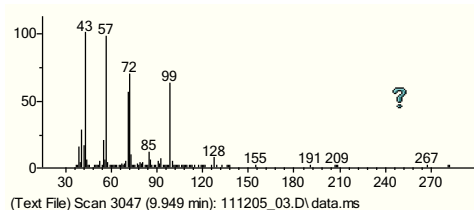
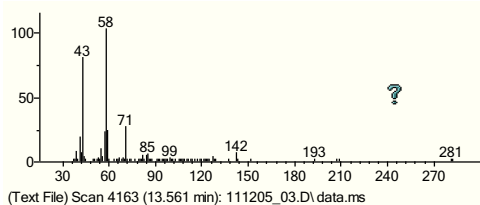


Tabelle 7.44: Massenspektren von Nonan-2-on und Undecan-2-ol ( $WTu_{WCO}$  Kinetik) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)

## Nonan-2-on (HP-Innowax)



## Undecan-2-ol (HP-Innowax)

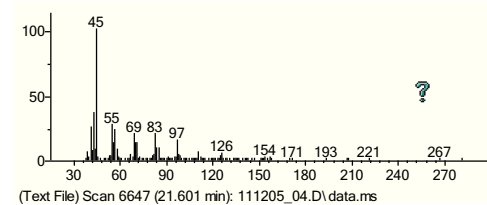
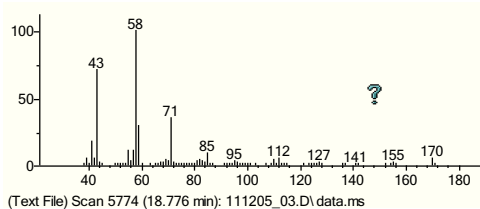


Tabelle 7.45: Massenspektren von Undecan-2-on und Caprinsäureethylester ( $WTu_{WCO}$  Kinetik) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)

## Undecan-2-on (HP-Innowax)



## Caprinsäureethylester (HP-Innowax)

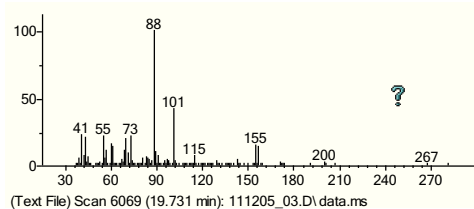


Tabelle 7.46: Massenspektren von  $\alpha$ -Muurolen und  $\beta$ -Ocimen ( $WTu_{WCO}$  Kinetik) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)

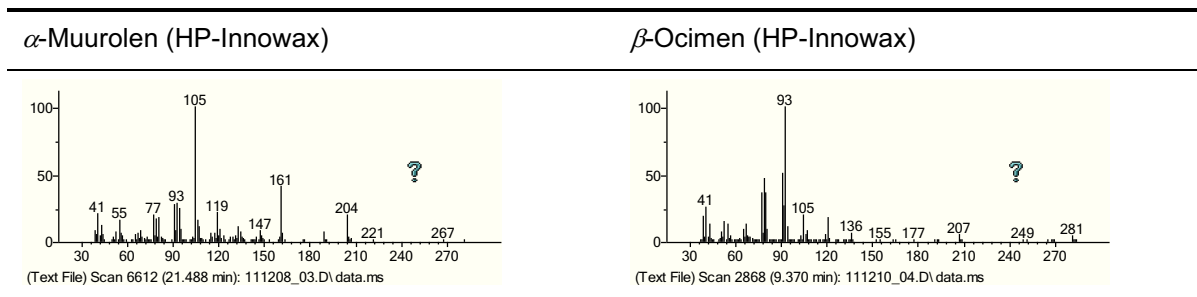


Tabelle 7.47: Massenspektren von Decan-2-on und  $\beta$ -Cadinen ( $WTu_{WCO}$  Kinetik) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)

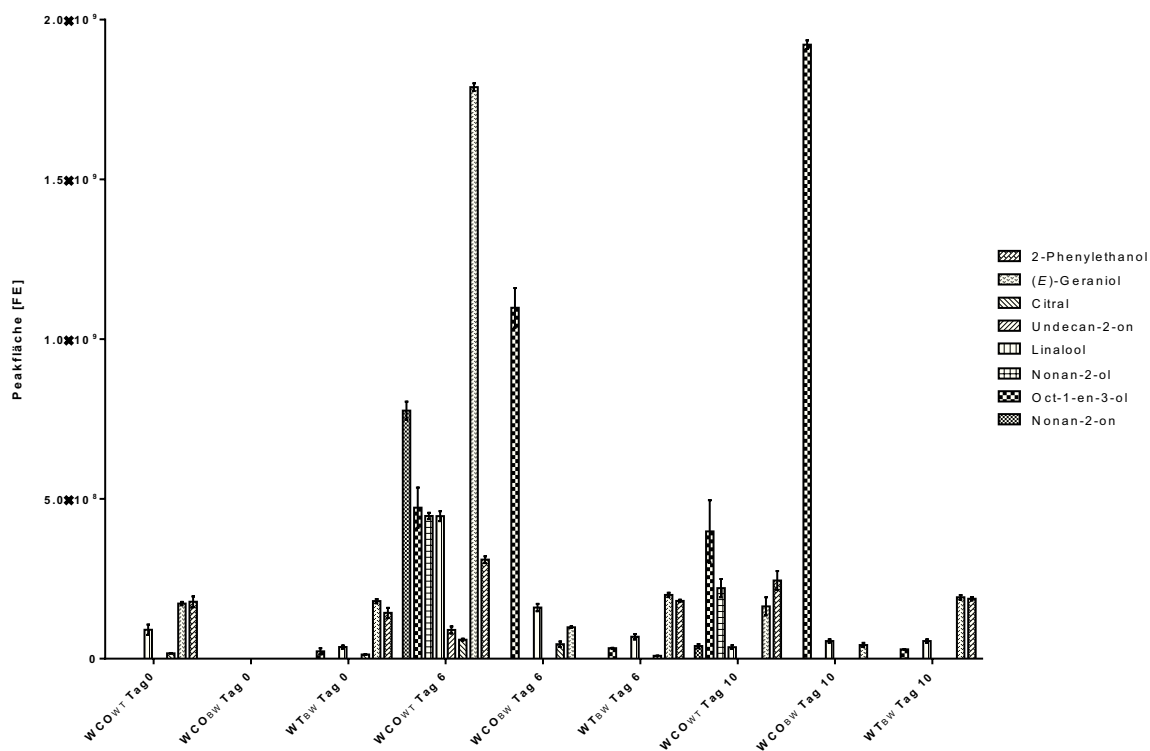
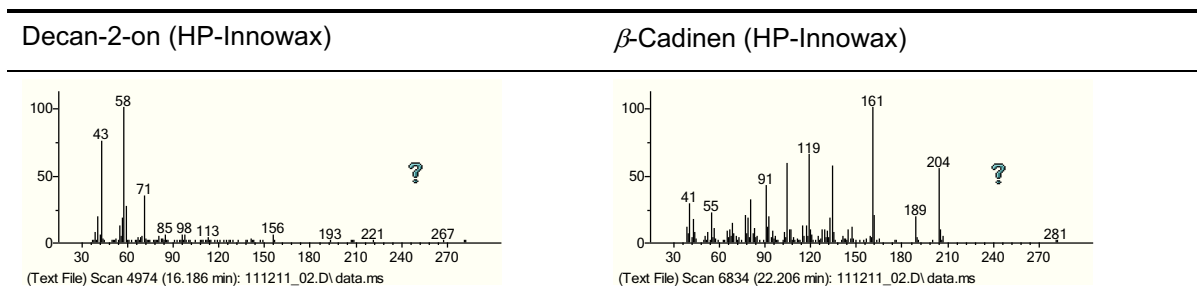


Abbildung 7.63: Bildung aromarelevanter flüchtiger Verbindungen an Kulturtag 0, 6 und 10 der Kultivierung von *W. cocos* mit unbehandeltem Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer) ( $WCO_{WTu}$ ), dem Substratblindwert unbehandelter Weintresterpresskuchen (Gewürztraminer) ( $WTu_{BW}$ ) und dem Pilzblindwert *W. cocos* ( $WCO_{BW}$ )

### Bildung flüchtiger Verbindungen im Kulturverlauf von *T. chioneus* mit lyophilisiertem Apfeltrester

Im Folgenden werden nur Massenspektren der Substanzen aufgeführt, die noch nicht gezeigt wurden.

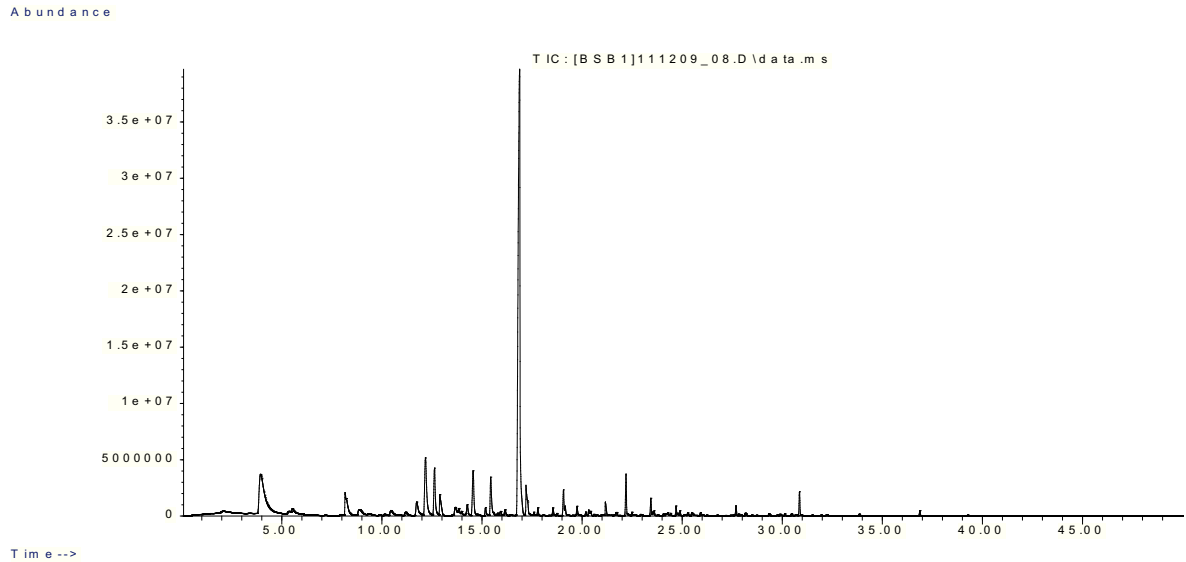


Abbildung 7.64: GC/MS-Chromatogramm der HS-SPME-Extraktion der Kultivierung von *T. chioneus* mit lyophilisiertem Apfeltrester (Tag 0) (n=4)

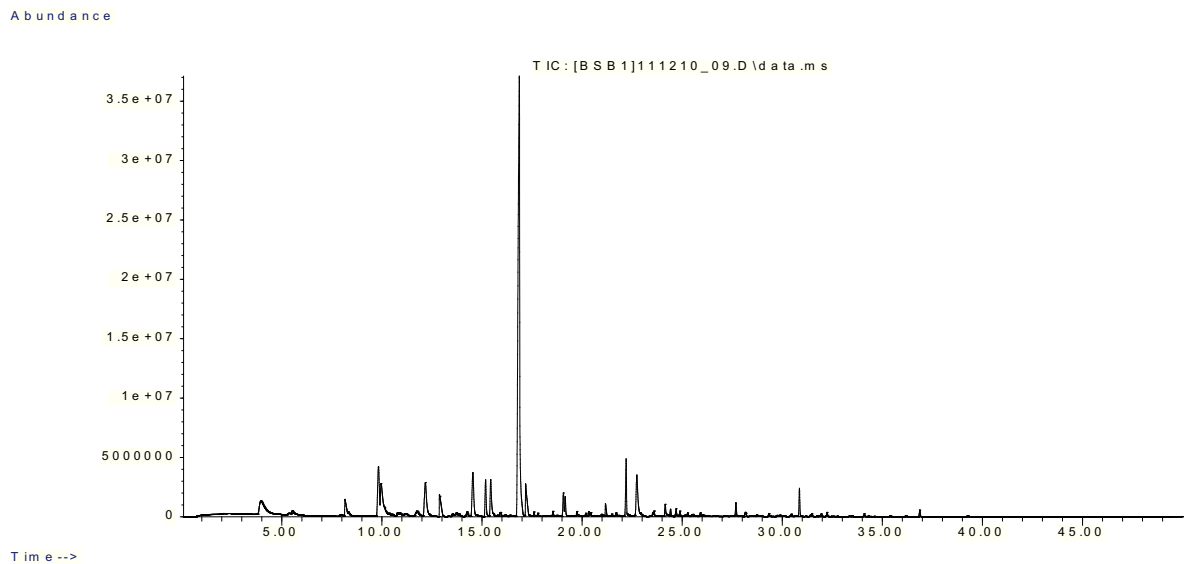


Abbildung 7.65: GC/MS-Chromatogramm der HS-SPME-Extraktion der Kultivierung von *T. chioneus* mit lyophilisiertem Apfeltrester (Kulturtag 1) (n=4)

Abundance

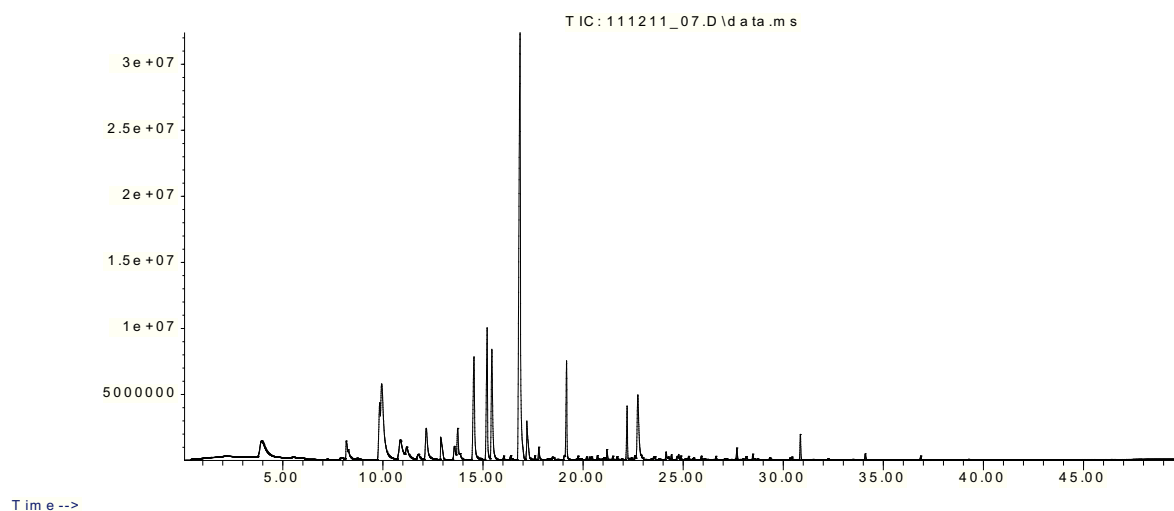


Abbildung 7.66: GC/MS-Chromatogramm der HS-SPME-Extraktion der Kultivierung von *T. chioneus* mit lyophilisiertem Apfeltrester (Kulturtag 2) (n=4)

Abundance

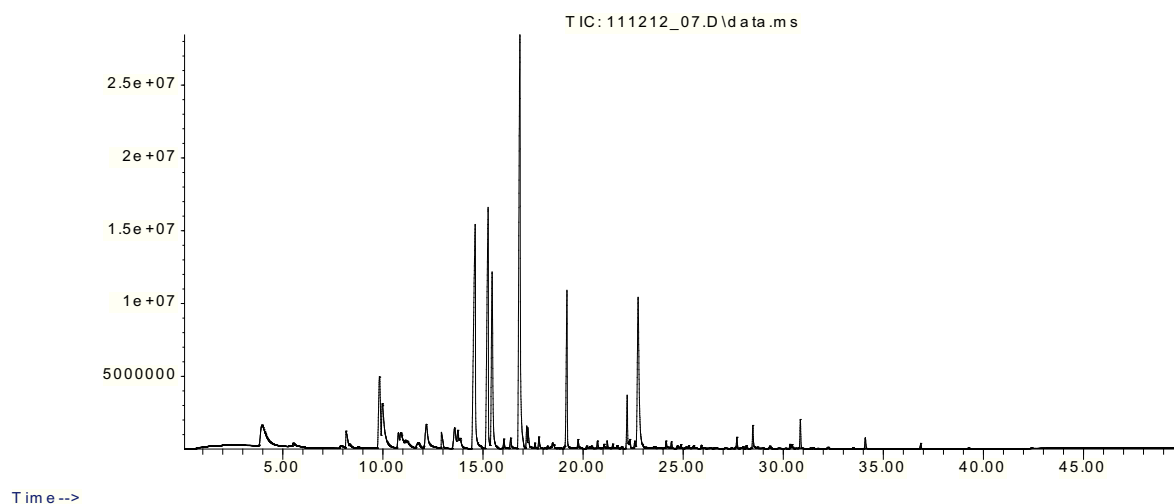


Abbildung 7.67: GC/MS-Chromatogramm der HS-SPME-Extraktion der Kultivierung von *T. chioneus* mit lyophilisiertem Apfeltrester (Kulturtag 3) (n=4)

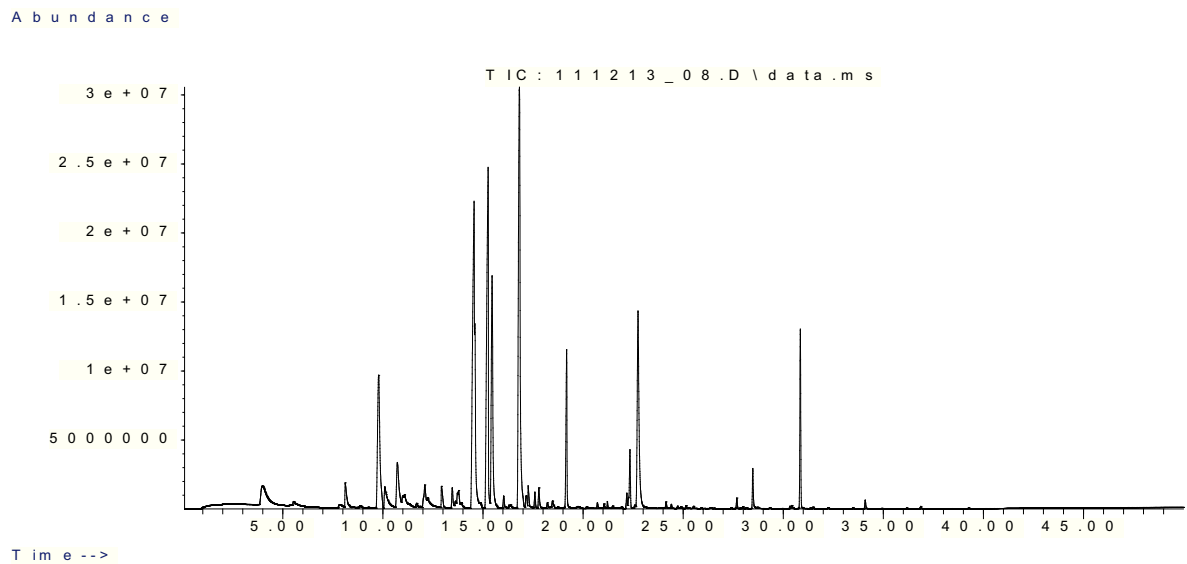


Abbildung 7.68: GC/MS-Chromatogramm der HS-SPME-Extraktion der Kultivierung von *T. chioneus* mit lyophilisiertem Apfeltrester (Kulturtag 4) ( $n=4$ )

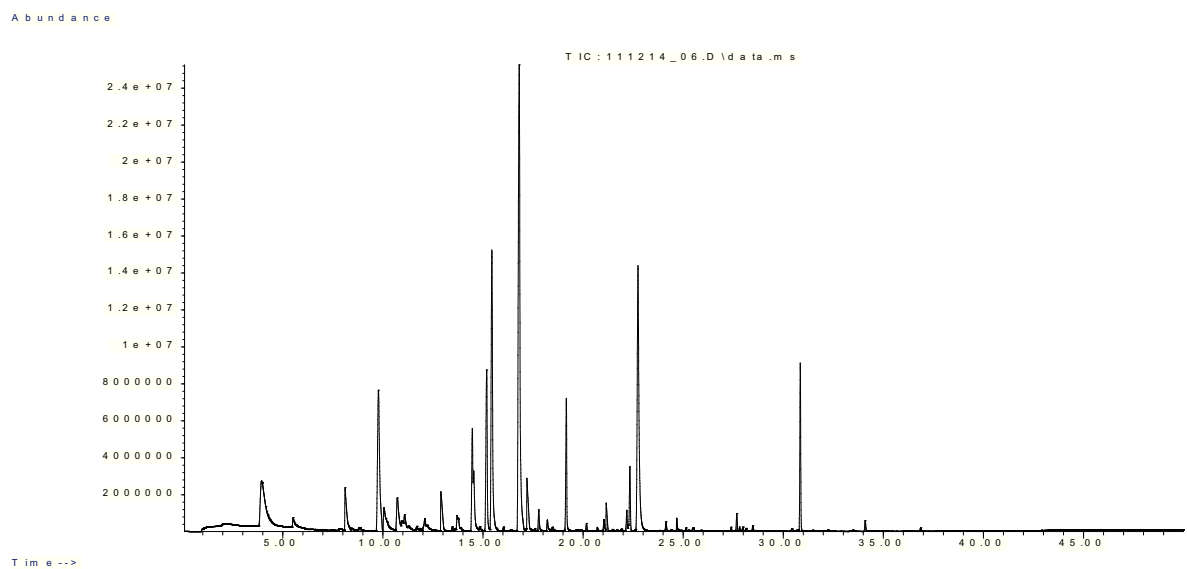


Abbildung 7.69: GC/MS-Chromatogramm der HS-SPME-Extraktion der Kultivierung von *T. chioneus* mit lyophilisiertem Apfeltrester (Kulturtag 5) ( $n=4$ )

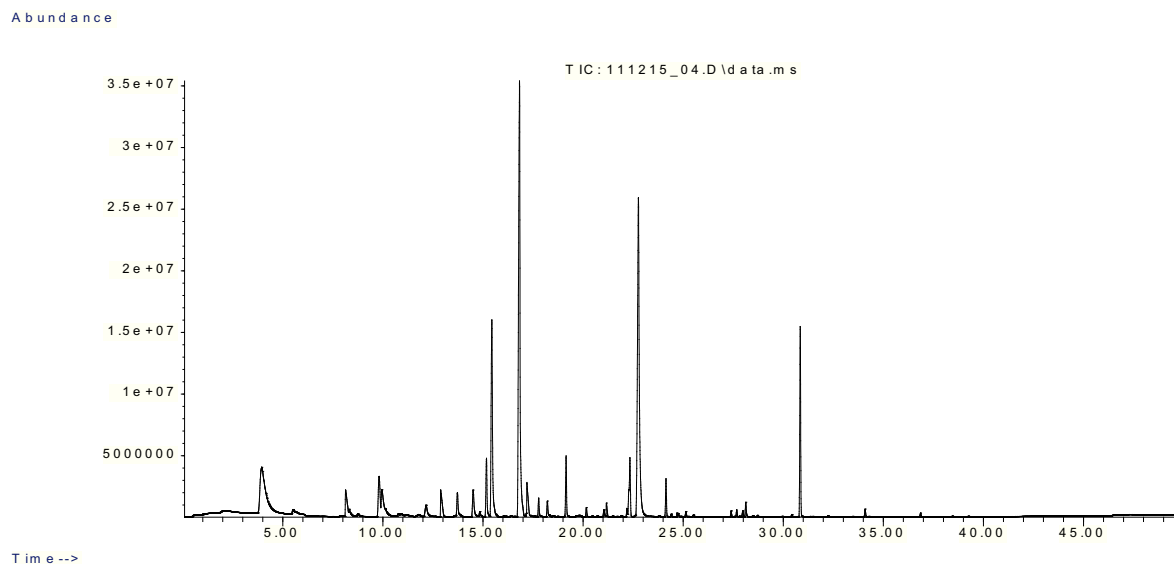


Abbildung 7.70: GC/MS-Chromatogramm der HS-SPME-Extraktion der Kultivierung von *T. chioneus* mit lyophilisiertem Apfeltrester (Kulturtag 6) ( $n=3$ )

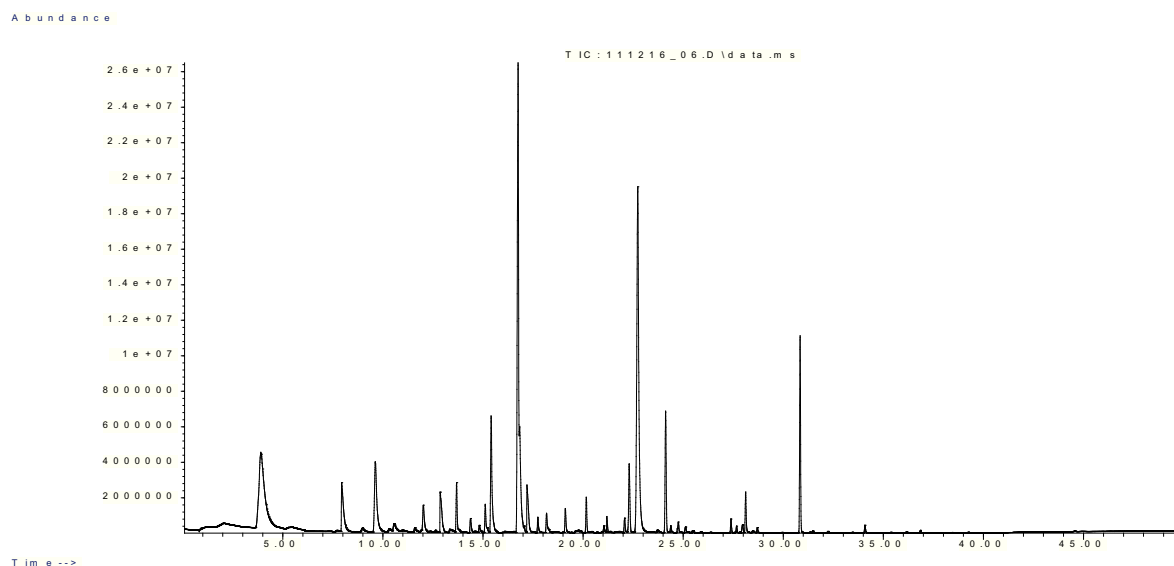


Abbildung 7.71: GC/MS-Chromatogramm der HS-SPME-Extraktion der Kultivierung von *T. chioneus* mit lyophilisiertem Apfeltrester (Kulturtag 7) ( $n=4$ )



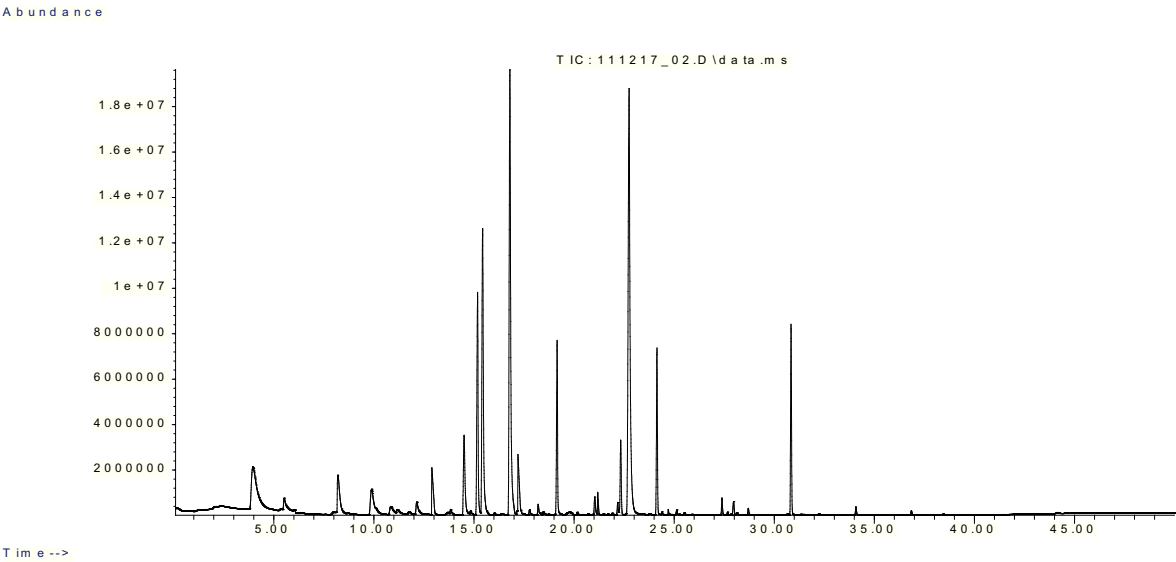


Abbildung 7.72: GC/MS-Chromatogramm der HS-SPME-Extraktion der Kultivierung von *T. chioneus* mit lyophilisiertem Apfeltrester (Kulturtag 8) (n=4)

Tabelle 7.48: Massenspektren von  $\beta$ -Ionon und Zimtsäuremethylester ( $TCH_{AT\ Kinetik}$ ) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)

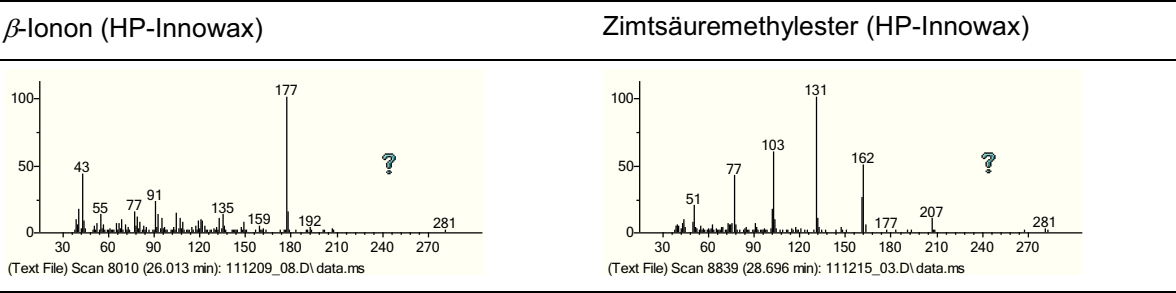


Tabelle 7.49: Massenspektren von Dihydropseudoionon und  $\beta$ -Damascon ( $TCH_{AT\ Kinetik}$ ) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)

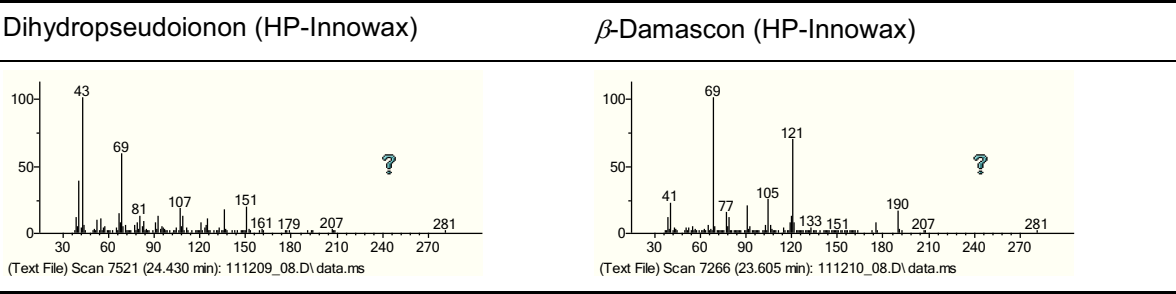


Tabelle 7.50: Massenspektren von Methyl-2-furoat und Hydrozimsäuremethylester ( $TCH_{AT}$  Kinetik) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)

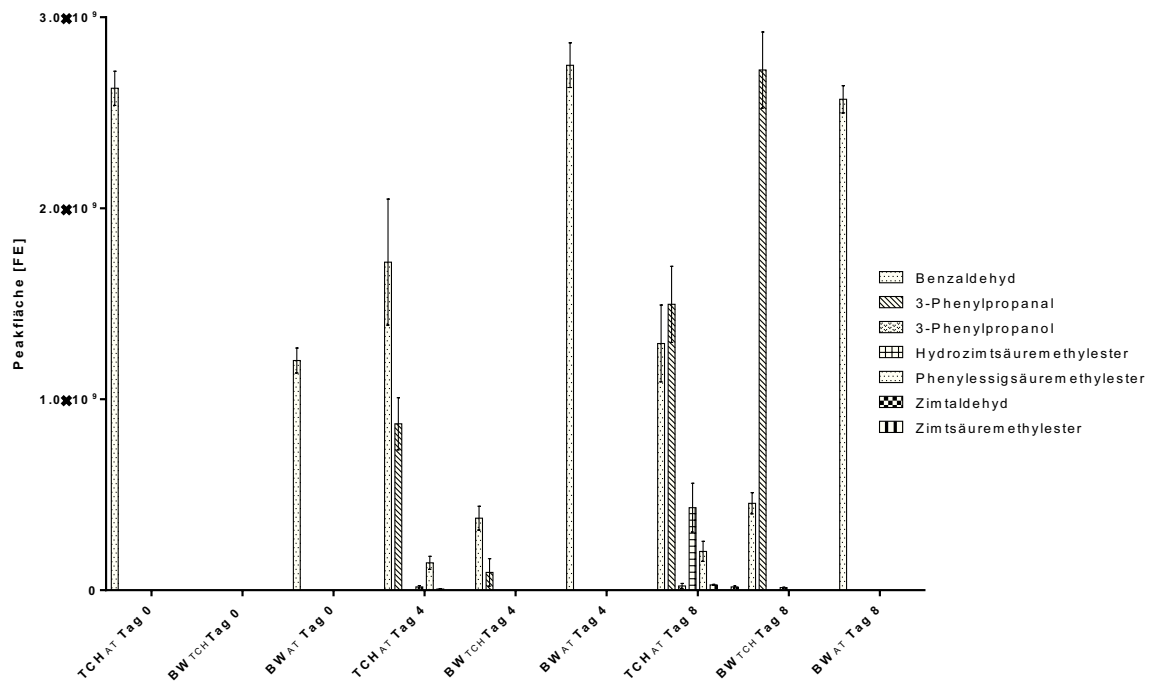
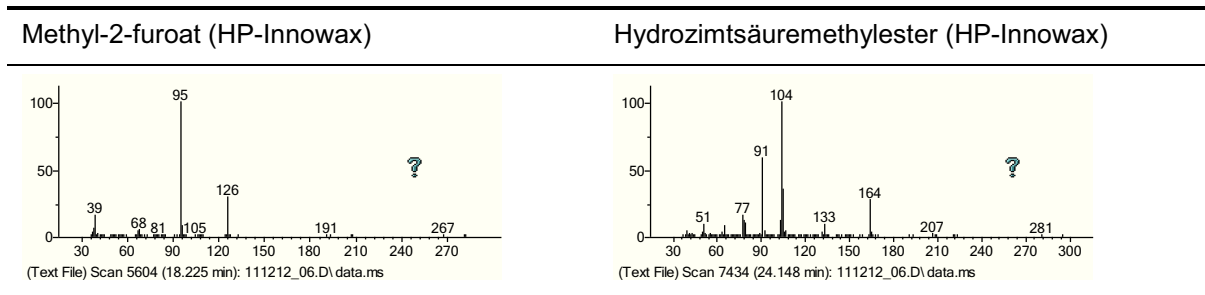


Abbildung 7.73: Bildung von benzoiden und phenylpropanoiden Verbindungen an Kulturtag 0, 4 und 8 der Kultivierung von *T. chioneus* mit lyophilisiertem Apfeltrester ( $TCH_{AT}$ ), dem Substratblindwert Apfeltrester ( $AT_{BW}$ ) und dem Pilzblindwert *T. chioneus* ( $TCH_{BW}$ ) im Maßstab 4:1

### Maßstabsvergrößerung der Biotransformation von Apfeltrester durch *T. chioneus* (400 mL und 4 L Medium M2)

Im Folgenden werden nur Massenspektren der Substanzen aufgeführt, die noch nicht gezeigt wurden.

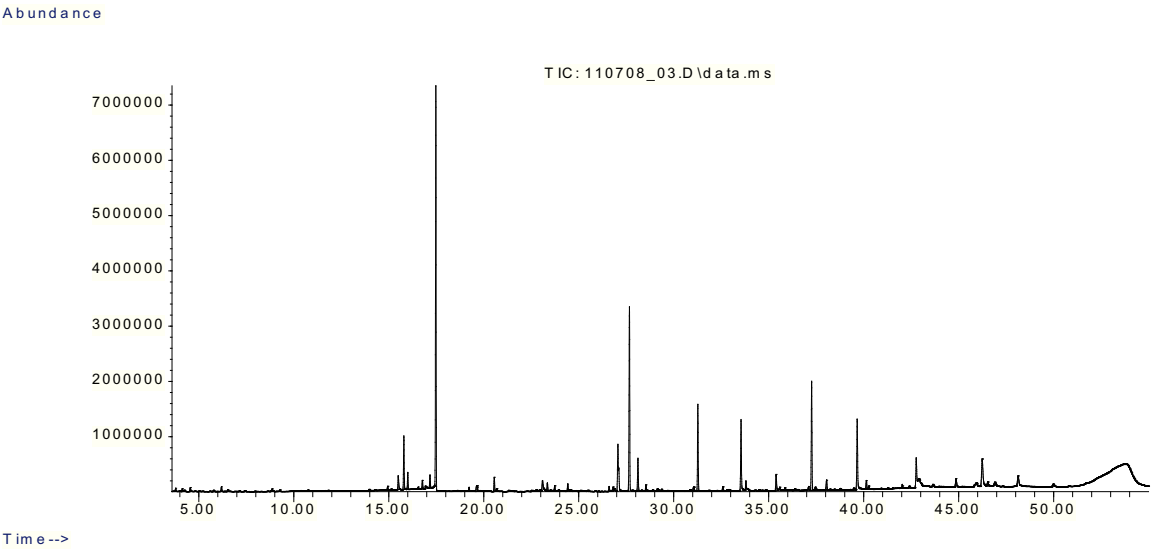


Abbildung 7.74: GC/MS-Chromatogramm der Kultivierung von *T. chioneus* mit unbehandeltem Apfeltrester (400 mL Medium M2; Kulturtag 4)

Tabelle 7.51: Massenspektren von Hexadecan und n-Hexadecansäure ( $TCH_{ATU}$ , 400 mL Medium M2) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)

Hexadecan (HP-Innowax)	n-Hexadecansäure (HP-Innowax)
<p>(Text File) Scan 4834 (19.233 min): 110708_03.D\data.ms</p>	<p>(Text File) Scan 12108 (42.776 min): 110708_03.D\data.ms</p>

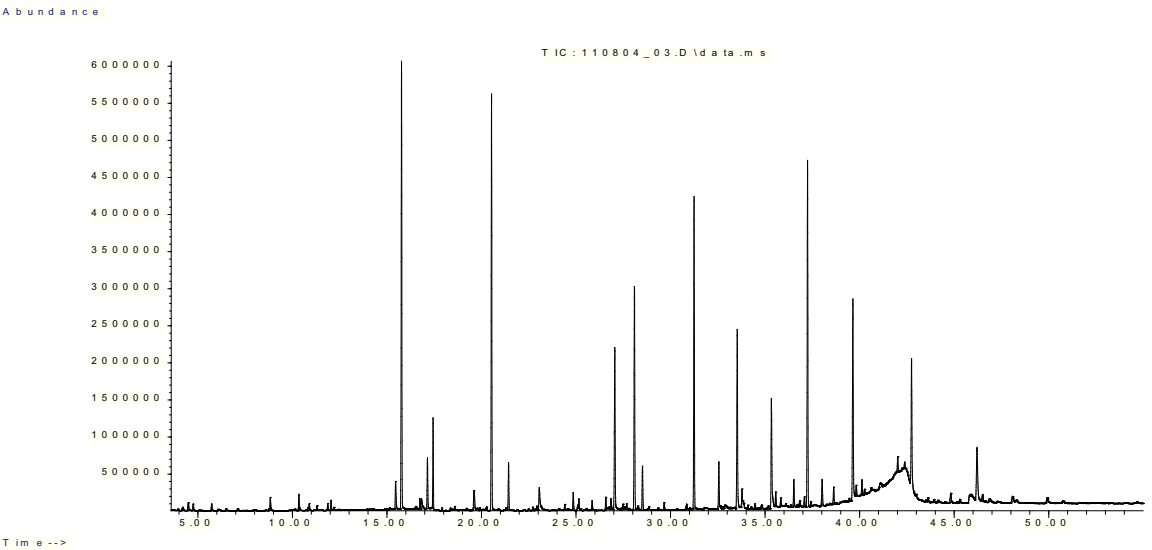


Abbildung 7.75: GC/MS-Chromatogramm der Kultivierung von *T. chioneus* mit unbehandeltem Apfeltrester (4 L Medium M2; Kulturtag 4)

Tabelle 7.52: Massenspektren von Methylpyrazin und 2,6-Dimethylpyrazin ( $TCH_{ATu}$ , 4 L Medium M2) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)

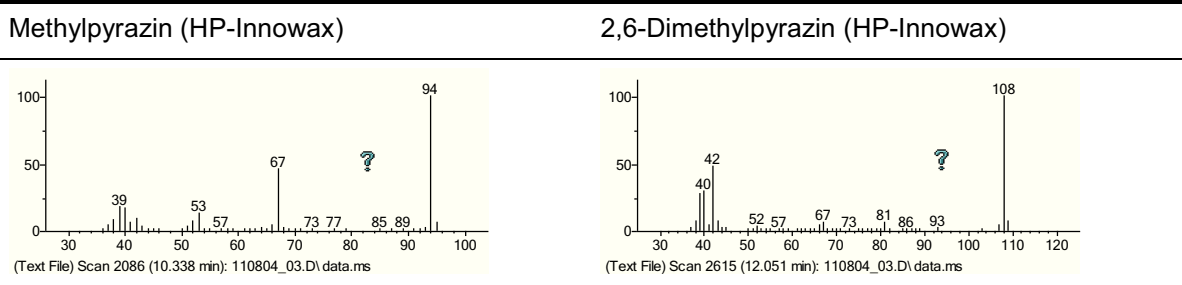


Tabelle 7.53: Massenspektren von 2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-on und 5-Hydroxymethylfurfural ( $TCH_{ATu}$ , 4 L Medium M2) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)

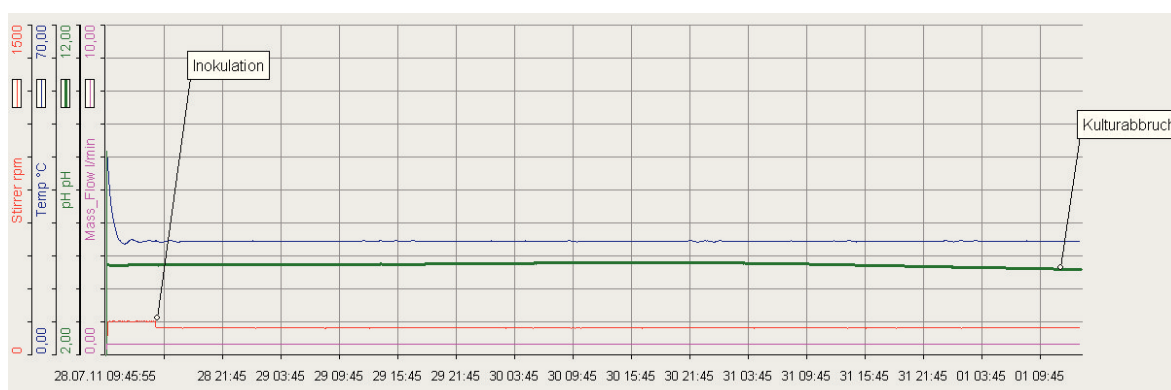
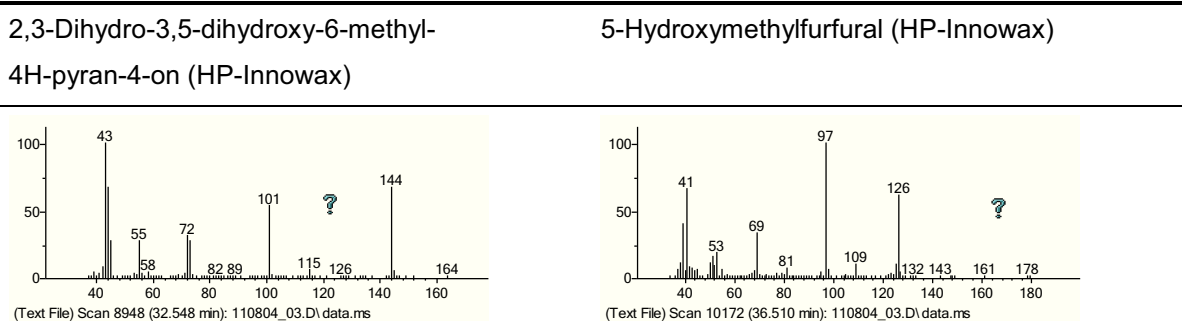


Abbildung 7.76: Kulturparameter der Biotransformation von unbehandeltem Apfeltrester durch *T. chioneus* im Maßstab 40:1 (4 L Medium M2)

### Untersuchung der flüchtigen Verbindungen aus der Kultivierung von *T. chioneus* mit unbehandeltem Apfeltrester sowie des Permeats und des Konzentrats der Pervaporation mittels HS-SPME

Im Folgenden werden nur Massenspektren der Substanzen aufgeführt, die noch nicht gezeigt wurden.

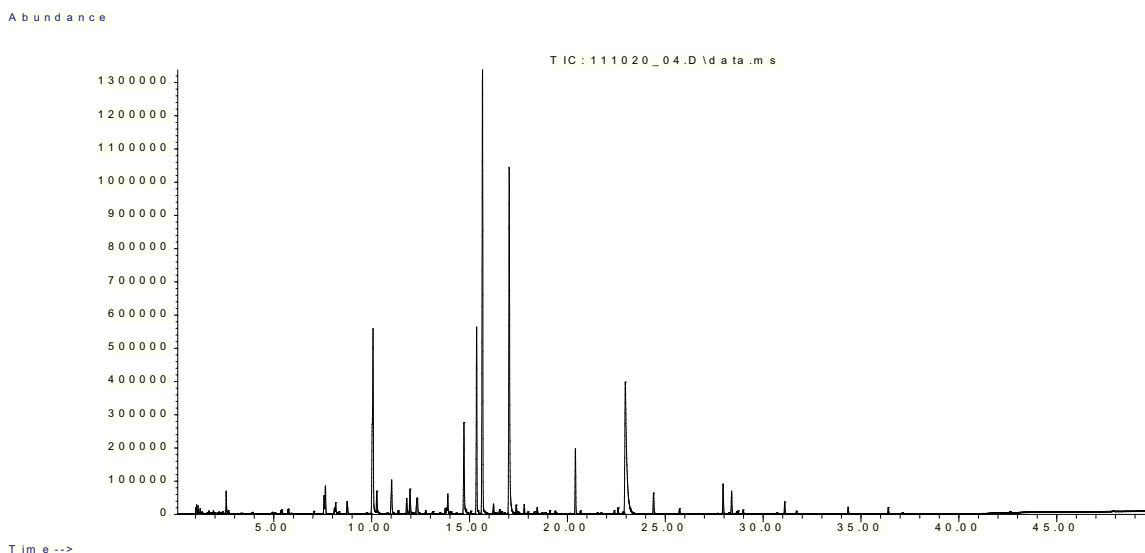
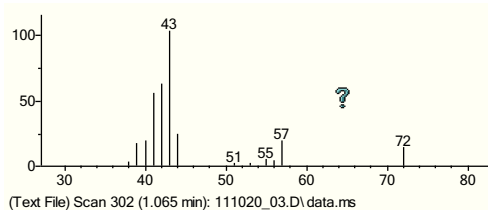


Abbildung 7.77: GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) der HS-SPME-Extraktion der Kultivierung von *T. chioneus* mit unbehandeltem Apfeltrester ( $TCH_{ATu}$ , Kulturtag 4, 5 L Medium M2)

Tabelle 7.54: Massenspektren von Pentan und Ethanol ( $TCH_{ATu}$ , 5 L Medium M2) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)

Pentan (HP-Innowax)



Ethanol (HP-Innowax)

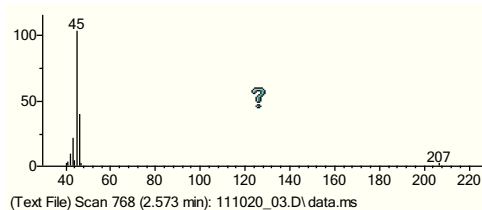
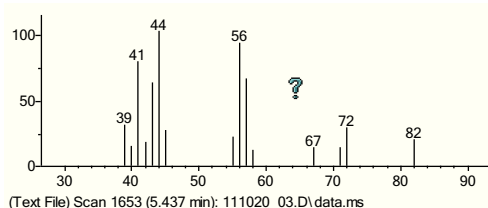


Tabelle 7.55: Massenspektren von Hexanal und 2-Methylheptan-3-on ( $TCH_{ATu}$ , 5 L Medium M2) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)

Hexanal (HP-Innowax)



2-Methylheptan-3-on (HP-Innowax)

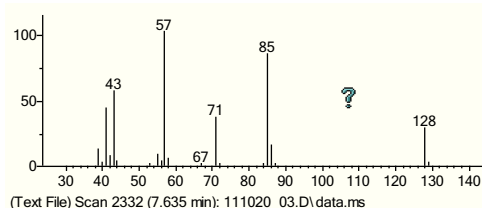
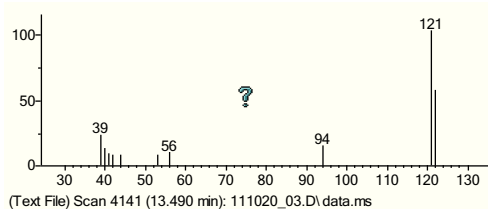
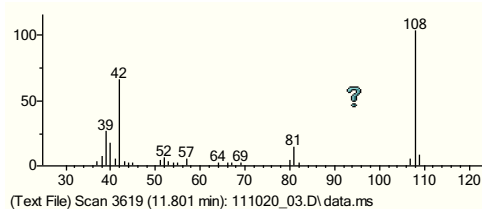


Tabelle 7.56: Massenspektren von 2-Ethyl-6-methylpyrazin und 2,5-Dimethylpyrazin ( $TCH_{ATu}$ , 5 L Medium M2) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)

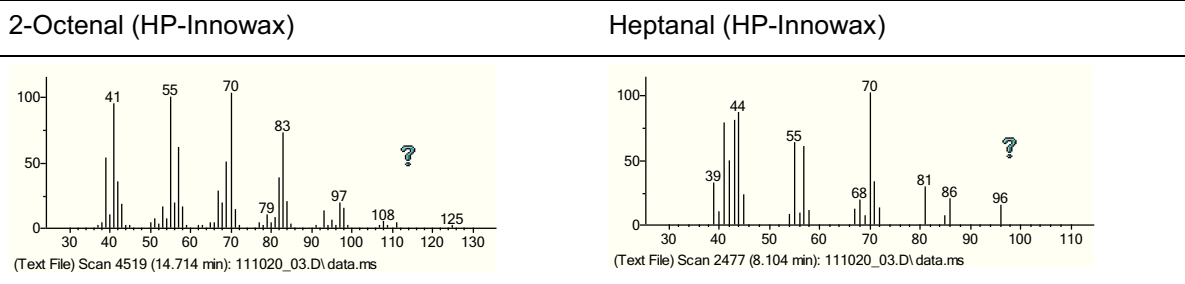
2-Ethyl-6-methylpyrazin (HP-Innowax)



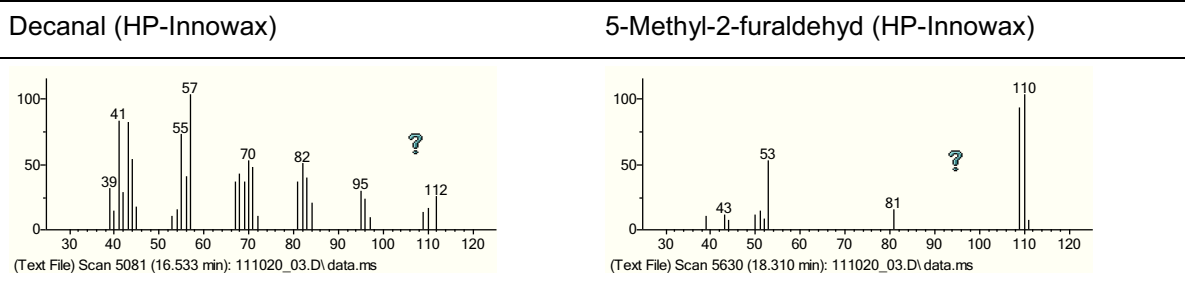
2,5-Dimethylpyrazin (HP-Innowax)



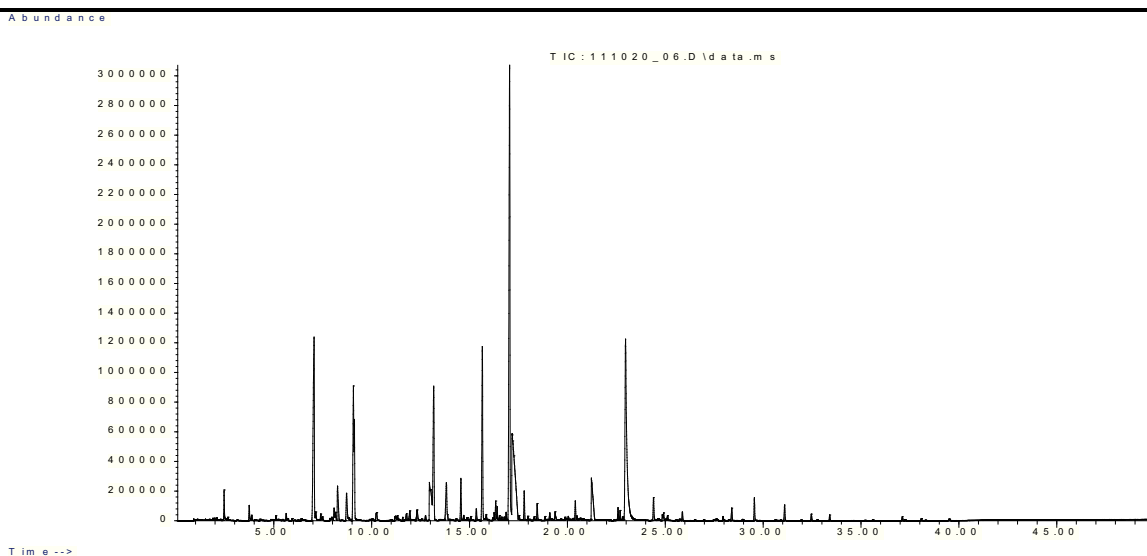
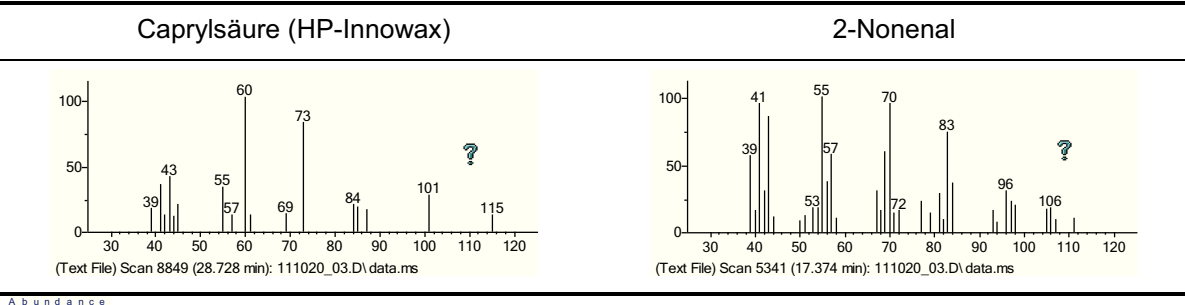
**Tabelle 7.57: Massenspektren von 2-Octenal und Heptanal ( $TCH_{ATu}$ , 5 L Medium M2) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)**



**Tabelle 7.58: Massenspektren von Decanal und 5-Methyl-2-furaldehyd ( $TCH_{ATu}$ , 5 L Medium M2) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)**

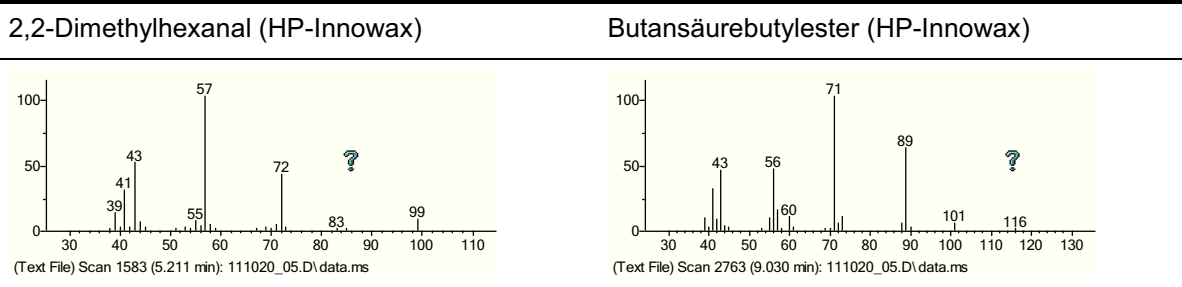


**Tabelle 7.59: Massenspektren von Caprylsäure und 2-Nonenal ( $TCH_{ATu}$ , 5 L Medium M2) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)**

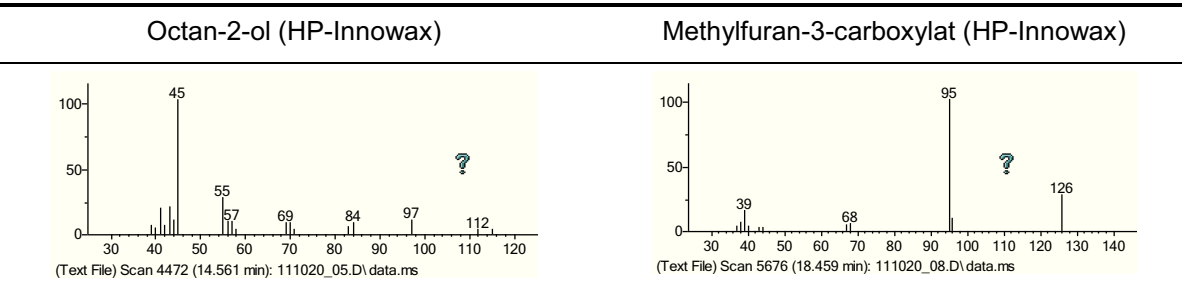


**Abbildung 7.78: GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) der HS-SPME-Extraktion des Konzentrats der Kultivierung von *T. chionaeus* mit unbehandeltem Apfeltrester ( $TCH_{ATu}$ , Kulturtag 4, 5 L Medium M2)**

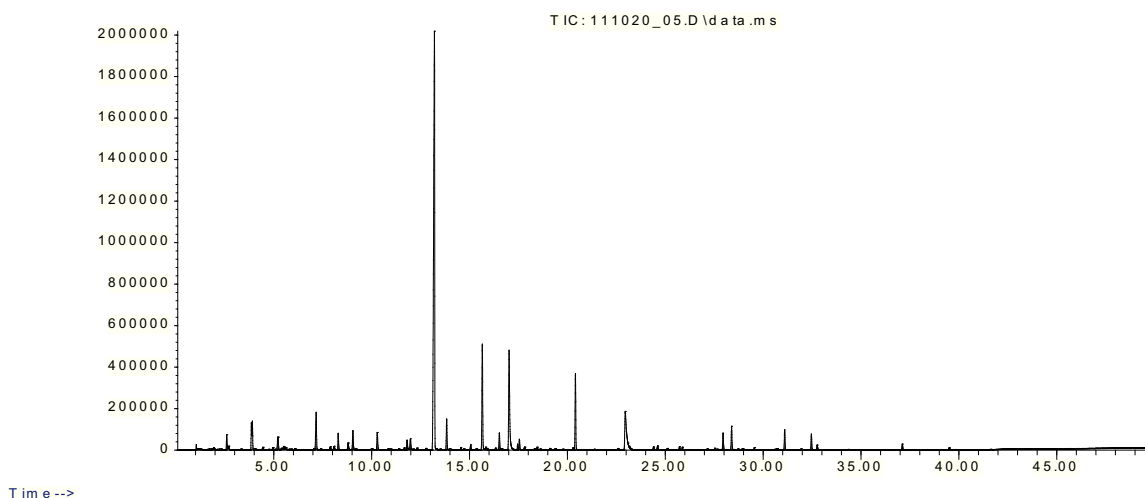
**Tabelle 7.60:** Massenspektren von 2,2-Dimethylhexanal und Butansäurebutylester ( $TCH_{ATu}$ , 5 L Medium M2, Konzentrat) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)



**Tabelle 7.61:** Massenspektren von Octan-2-ol und Methylfuran-3-carboxylat ( $TCH_{ATu}$ , 5 L Medium M2, Konzentrat) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)



Abundance



**Abbildung 7.79:** GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) der HS-SPME-Extraktion des Permeats der Kultivierung von *T. chioneus* mit unbehandeltem Apfeltrester ( $TCH_{ATu}$ , Kulturtag 4, 5 L Medium M2)

Tabelle 7.62: Massenspektren von 2-Ethylhexanal und 2-Ethylhexanol ( $TCH_{ATu}$ , 5 L Medium M2, Permeat) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)

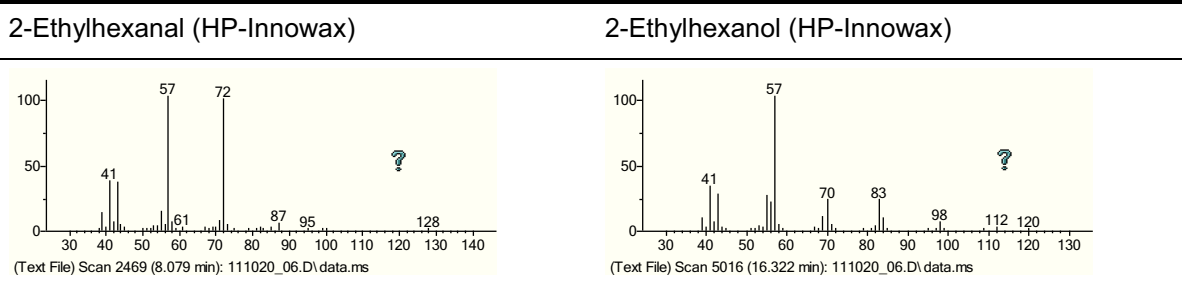
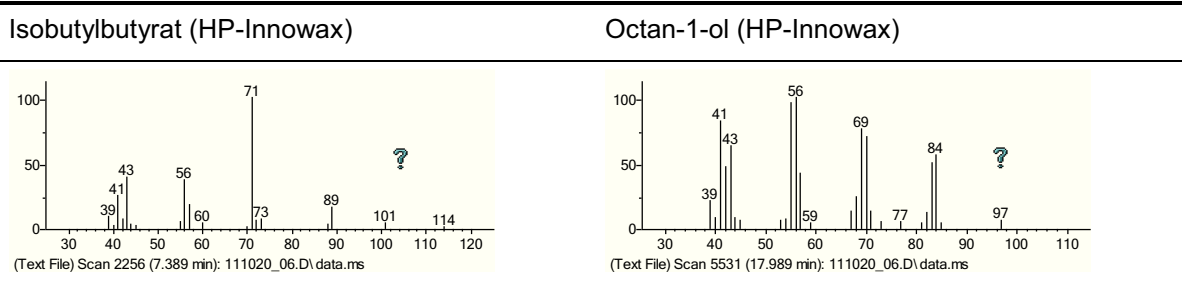


Tabelle 7.63: Massenspektren von Isobutylbutyrat und Octan-1-ol ( $TCH_{ATu}$ , 5 L Medium M2, Permeat) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)



### Untersuchung der flüchtigen Verbindungen aus der Kultivierung von *T. chioneus* mit unbehandeltem Apfeltrester sowie des Permeats und des Konzentrats der Pervaporation mittels flüssig/flüssig Extraktion

Im Folgenden werden nur Massenspektren der Substanzen aufgeführt, die noch nicht gezeigt wurden.

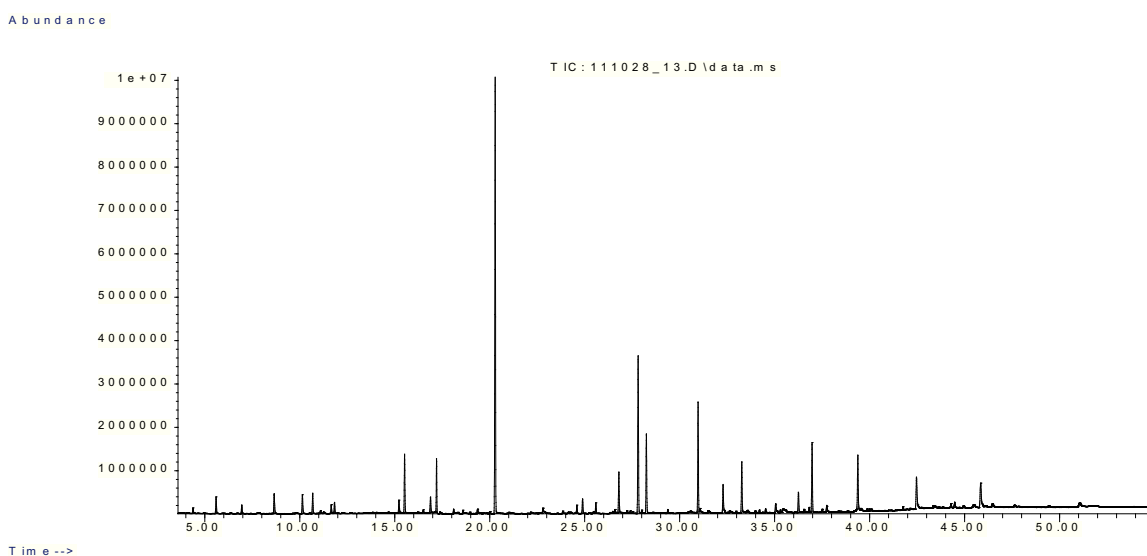


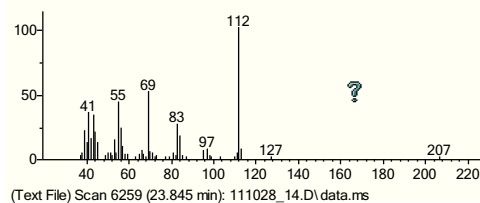
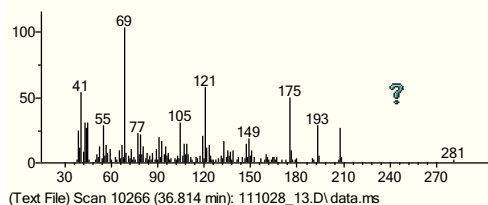
Abbildung 7.80: GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) des Extraktes der Kultivierung von *T. chioneus* mit unbehandeltem Apfeltrester ( $TCH_{ATu}$ , Kulturtag 4, 5 L Medium M2)



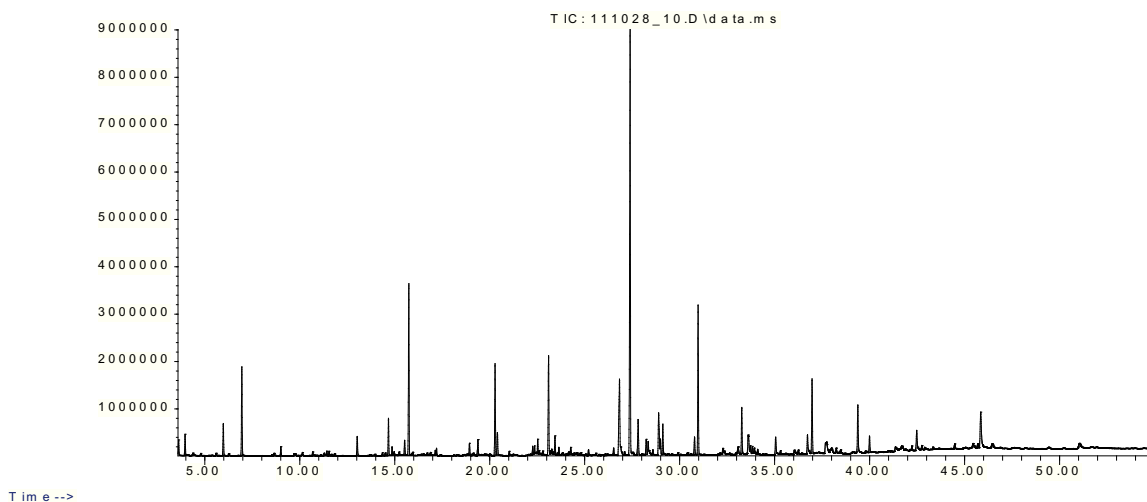
**Tabelle 7.64:** Massenspektren von 3-Hydroxy- $\beta$ -damascon und 2-Hydroxy-3-methyl-2-cyclopenten-1-on ( $TCH_{ATu}$ , 5 L Medium M2) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)

3-Hydroxy- $\beta$ -damascon (HP-Innowax)

2-Hydroxy-3-methyl-2-cyclopenten-1-on  
(HP-Innowax)



Abundance



**Abbildung 7.81:** GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) des Extraktes des Konzentrats der Kultivierung von *T. chioneus* mit unbehandeltem Apfeltrester ( $TCH_{ATu}$ , Kulturtag 4, 5 L Medium M2)

**Tabelle 7.65:** Massenspektren von 2-Methyldecan und 6-Propyltridecan ( $TCH_{ATu}$ , 5 L Medium M2, Konzentrat) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)

2-Methyldecan (HP-Innowax)

6-Propyltridecan (HP-Innowax)

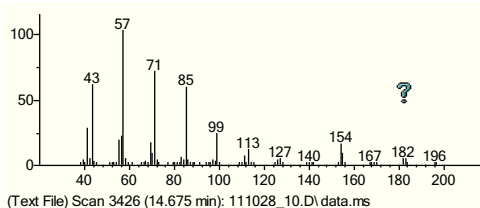
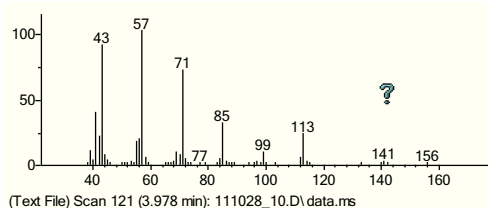


Tabelle 7.66: Massenspektrum von Dodecylhexanoat ( $TCH_{ATu}$ , 5 L Medium M2, Konzentrat) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)

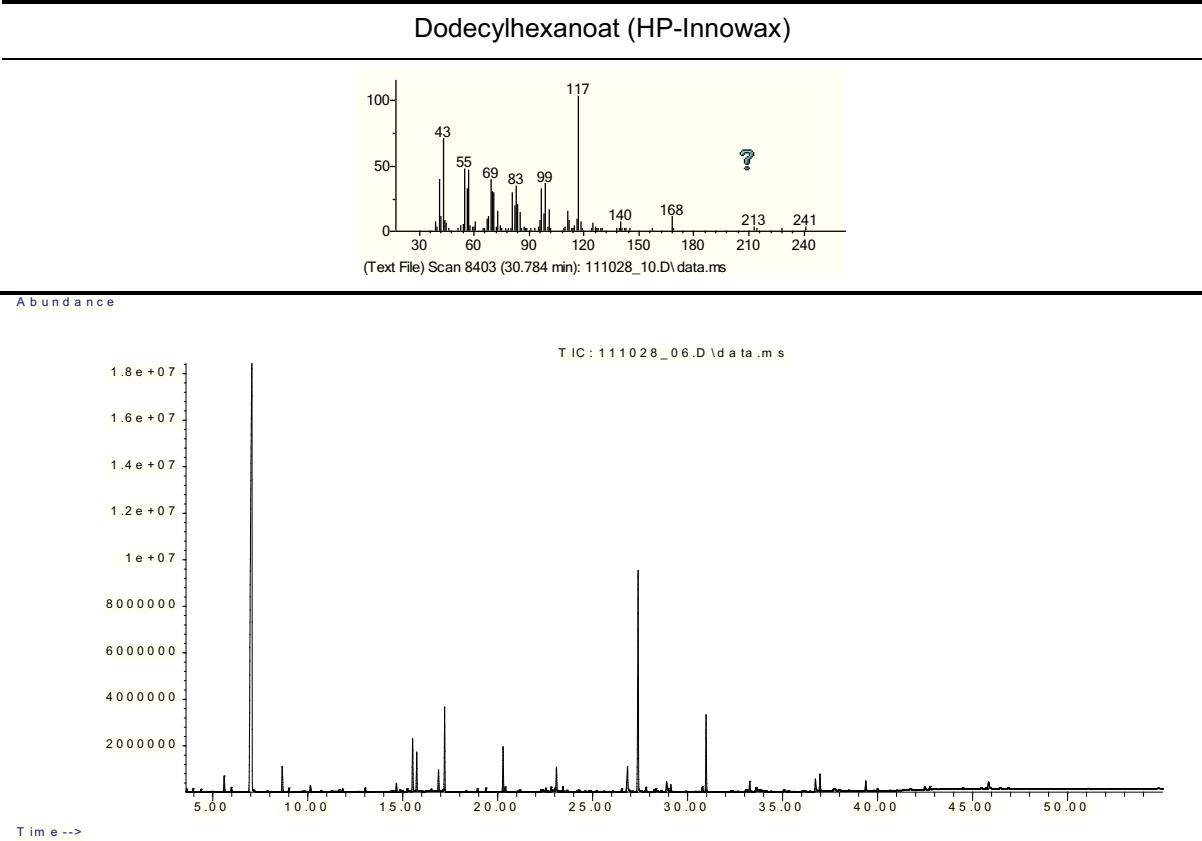


Abbildung 7.82: GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) des Extraktes des Permeats der Kultivierung von *T. chioneus* mit unbehandeltem Apfeltrester ( $TCH_{ATu}$ , Kulturtag 4, 5 L Medium M2)

Tabelle 7.67: Massenspektren von Decan und Dodecan-1-ol ( $TCH_{ATu}$ , 5 L Medium M2, Permeat) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)

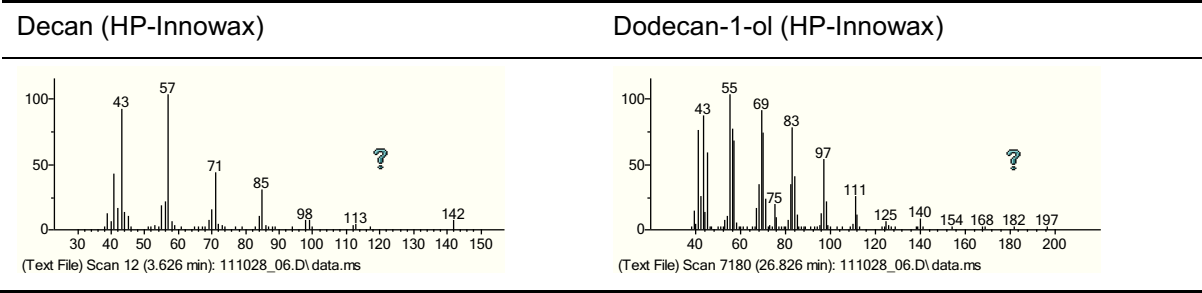
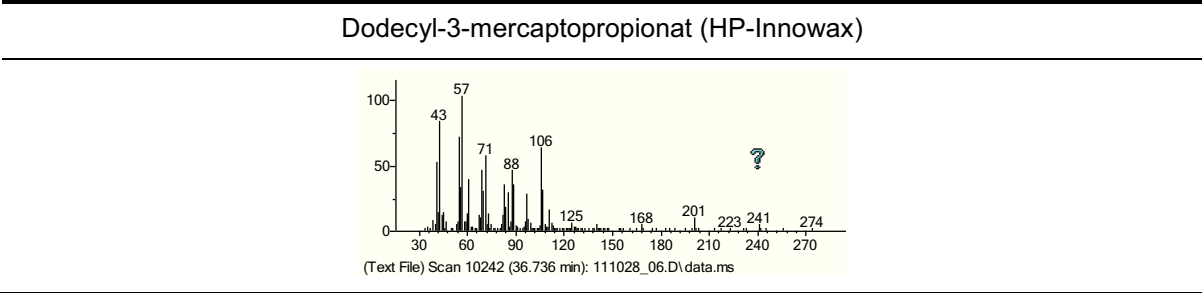


Tabelle 7.68: Massenspektrum von Dodecyl-3-mercaptopropionat ( $TCH_{ATu}$ , 5 L Medium M2, Permeat) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)



## 7.2 Entwicklung neuartiger Getränke durch den Einsatz von essbaren Basidiomyceten

### Screening und Kulturparameter

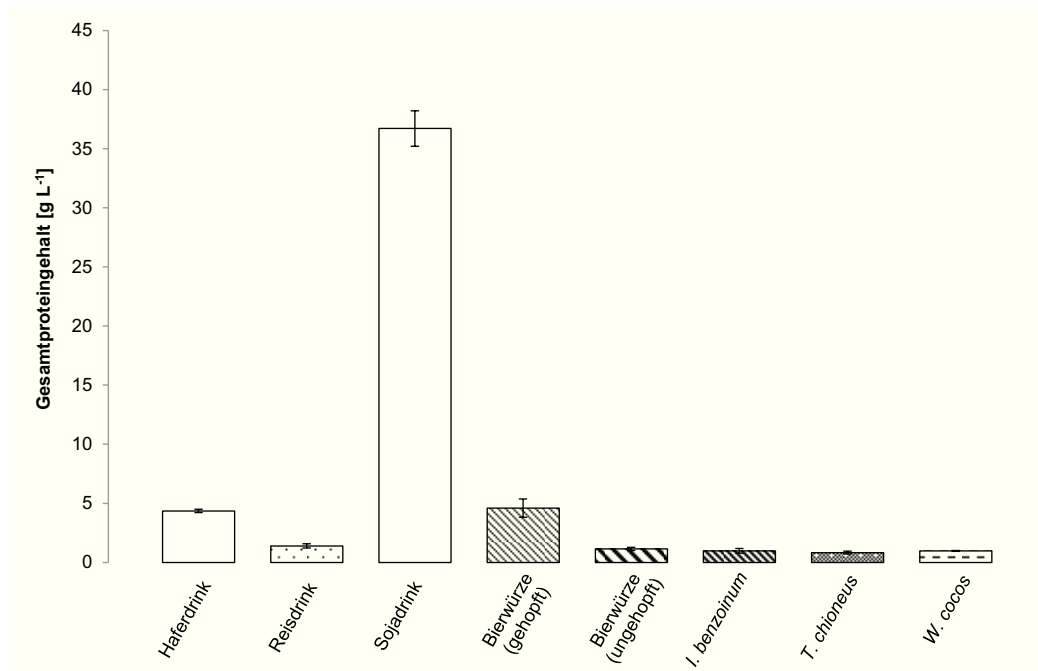


Abbildung 7.83: Gesamtproteingehalt der Substrate Haferdrink, Reisdrink, Sojadrink, Bierwürze (gehopft) und Bierwürze (ungehopft) sowie der Biotransformationen von ungehopfter Bierwürze durch *I. benzoinum* (7 h), *T. chioneus* (17 h) und *W. cocos* (25 h)

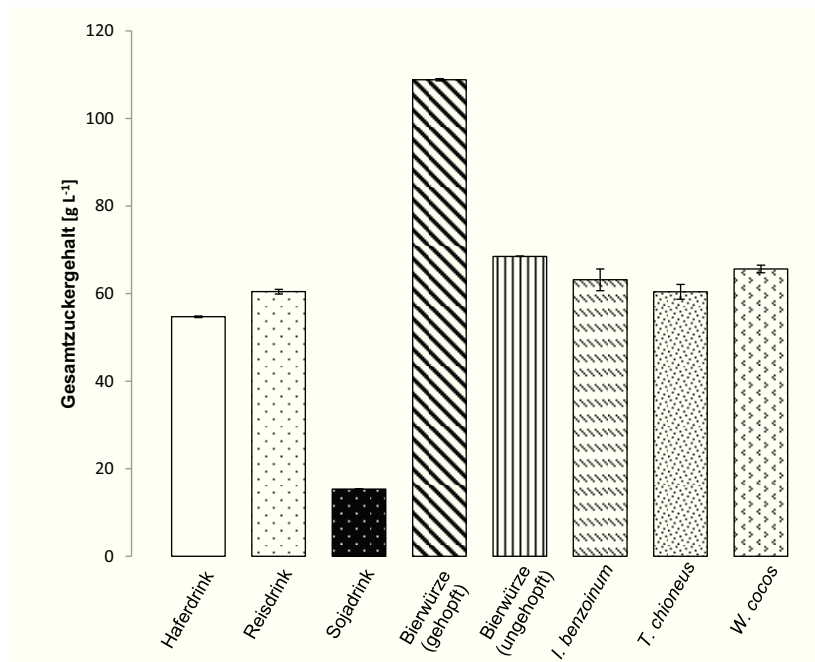


Abbildung 7.84: Gesamtzuckergehalt der Substrate Haferdrink, Reisdrink, Sojadrink, Bierwürze (gehopft), Bierwürze (ungehopft) sowie der Biotransformationen von ungehopfter Bierwürze durch *I. benzoinum* (7 h), *T. chioneus* (17 h) und *W. cocos* (25 h)

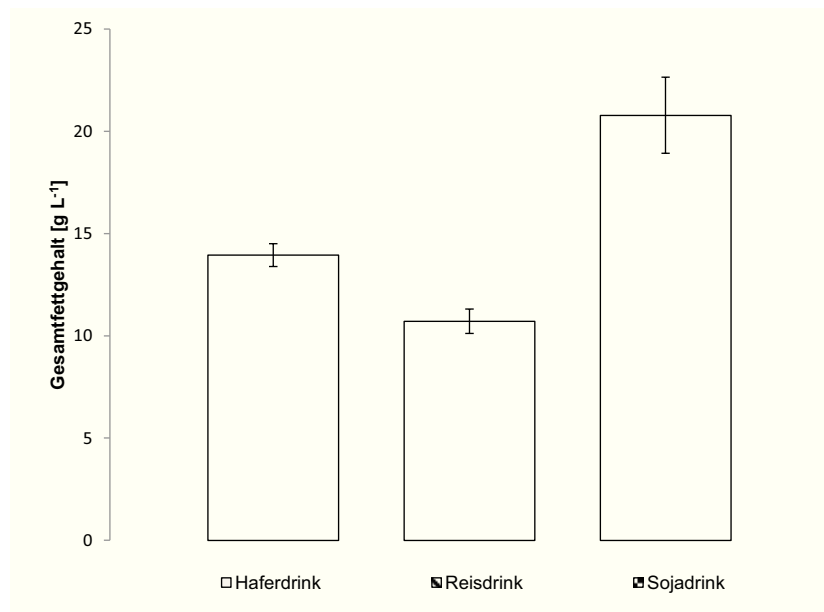


Abbildung 7.85: Gesamtfettgehalt der Substrate Haferdrink, Reisdrink und Sojadrink

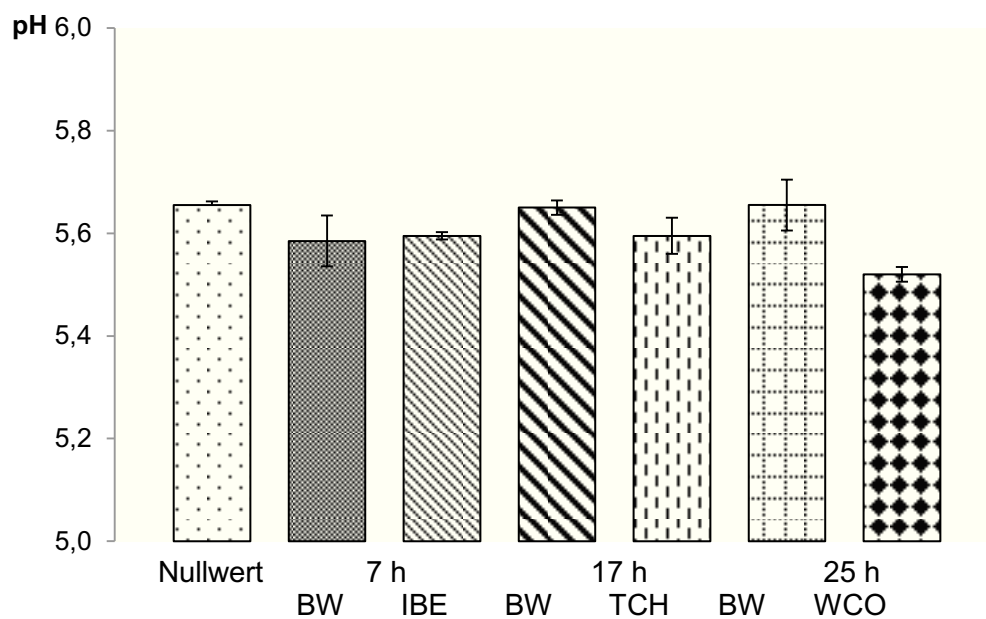


Abbildung 7.86: pH-Werte der ungehopften Bierwürze im Nullwert, der Substratblindwerte (7 h, 17 h, 25 h) und der Biotransformationen durch *I. benzoinum* (IBE, 7 h), *T. chioneus* (TCH, 17 h) und *W. cocos* (WCO, 25 h), BW: Blindwert

Tabelle 7.69: Geruchseindrücke der Kultivierung von *P. citrinopileatus* mit Haferdrink ( $HD_{PCI}$ )

Kultivierungs- dauer [h]	$HD_{BW}$	I	$HD_{PCI}$	I
2	Hafer, Getreide	2-3	weniger Hafer*, weniger Getreide*	2
4	Getreide, Hafer, süßlich	1-2	säuerlich, metallisch, Anis	2
6	Getreide, süßlich, Hafer	1-2	metallisch, säuerlich	2
8	Getreide, Hafer	1	modrig, Zitrone	1-2
10	Getreide, Hafer	1	metallisch, säuerlich, Pfirsich	2
24	Getreide, Hafer, wässrig	0-1	säuerlich, metallisch, Pfirsich	2

BW: Blindwert, I: Geruchsintensität (siehe 5.2.6), \*: im Vergleich zum Blindwert

Tabelle 7.70: Geruchseindrücke der Kultivierung von *I. benzoinum* mit ungehopfter Bierwürze ( $IBE_{BWZu}$ )

Kultivierungs- dauer [h]	$BWZu_{BW}$	I	$IBE_{BWZu}$	I
2	Malz, süßlich, würzig, Honig	5	süßlich, malzig, Honig, weniger schwer*, frisch	5
4	Malz, süßlich, würzig, Honig	4	süßlich, Malz, Honig, frisch,	5
6	Malz, süßlich, würzig, Honig	4	süßlich, Malz, Honig, frisch	5
8	malzig, süßlich, Honig	4	malzig, herb, weniger süßlich*	4
10	malzig, süßlich	3-4	Rüben, erdig, süßlich	4-5
24	säuerlich, süßlich		frisch, erdig, dumpf	5

BW: Blindwert, I: Geruchsintensität (siehe 5.2.6), \*: im Vergleich zum Blindwert

Tabelle 7.71: Geruchseindrücke der Kultivierung von *T. chioneus* mit ungehopfter Bierwürze ( $TCH_{BWZu}$ )

Kultivierungs- dauer [h]	$BWZu_{BW}$	I	$TCH_{BWZu}$	I
3	malzig, süßlich, würzig	5	malzig, weniger süßlich*, würzig	5
6	malzig, süßlich	4	herb, süßlich, würzig	5
18	süßlich, würzig	3-4	süßlich, herb, würzig	4
22	staubig, malzig, süßlich	2-3	herb, kratzig	3
26	süßlich, würzig, malzig	2-3	muffig, süßlich, reizend	3

BW: Blindwert, I: Geruchsintensität (siehe 5.2.6), \*: im Vergleich zum Blindwert

Tabelle 7.72: Geruchseindrücke der Kultivierung von *W. cocos* mit Reisdrink ( $RD_{WCO}$ )

Kultivierungs- dauer [h]	$RD_{BW}$	I	$RD_{WCO}$	I
3	wässrig, gekochte Stärke	1	weniger Stärkearoma*, wässrig	1
5	Reis, wässrig	1	Reis, Zitrone	1
21	Reiswasser	1	Zitrone, keine Reissnote	2
26	Reiswasser	1	Zitrone, muffig, beißend	3

BW: Blindwert, I: Geruchsintensität (siehe 5.2.6), \*: im Vergleich zum Blindwert

*Tabelle 7.73: Geruchseindrücke während der Kultivierung von W. cocos mit ungehopfter Bierwürze (WCO<sub>BWZu</sub>)*

Kultivierungs- dauer [h]	BWZu <sub>BW</sub>	I	WCO <sub>BWZu</sub>	I
3	würzig, malzig, bitter, süßlich	4-5	würziger*, süßlicher*, frisch, malziger*	5
5	malzig, süßlich, Honig	5	säuerlich, weniger süßlich*, frisch, Cidre, Schaumwein	5
21	süßlich, malzig	4	Zitrone, frisch	5
26	malzig, süßlich	4	Cidre, frisch, Zitrone	5

BW: Blindwert, I: Geruchsintensität (siehe 5.2.6), \*: im Vergleich zum Blindwert

*Tabelle 7.74: Gustatorische Bewertung der Kultivierung von P. citrinopileatus mit Haferdrink nach 3-5 und 9-11 h*

Kultivierungszeit [h]	HD <sub>BW</sub>	HD <sub>PCI</sub>
3	süß, Getreide, Hafer	weniger süß*, Pilz, weniger Getreide*
4	süß, Getreide, Hafer	weniger süß*, Pilz, wenig Getreide*
5	süß, Getreide, Hafer	erfrischend süß, wenig Getreide*
9	süß, Getreide, Hafer, Mehl	weniger süß*, Pilz, Getreide
10	weniger süß, Getreide	weniger süß*, frisch, Pilz, weniger Getreide*
11	weniger süß, Getreide, Hafer	süß, Pilz, weniger Getreide*

BW: Blindwert, I: Geruchsintensität (siehe 5.2.6), \*: im Vergleich zum Blindwert

*Tabelle 7.75: Gustatorische Bewertung der Kultivierung von I. benzoinum mit ungehopfter Bierwürze nach 3-5 und 5-7 h*

Kultivierungszeit [h]	BWZu <sub>BW</sub>	IBE <sub>BWZu</sub>
3	süß, Malz, würzig	süß, intensiver*, muffig, abgestanden
4	süß, Malz, würzig	grün, Gras/Heu, Pilz
5	süß, weniger Malz, würzig	grün, Gras, Pilz
6	süß, weniger Malz, würzig	grün, Gras, Pilz
7	süß, weniger Malz, würzig	grün, Gras

BW: Blindwert, \*: im Vergleich zum Blindwert

*Tabelle 7.76: Gustatorische Bewertung der Kultivierung von T. chioneus mit ungehopfter Bierwürze nach 17- 19 h*

Kultivierungszeit [h]	BWZu <sub>BW</sub>	TCH <sub>BWZu</sub>
17	süß, Malz, wässrig	blumig, süß, fruchtig, Honig
18	süß, Malz, wässrig	wässrig, süß, Honig
19	süß, Malz, wässrig	wässrig, süß, Honig

BW: Blindwert

Tabelle 7.77: Gustatorische Bewertung Kultivierung von *W. cocos* mit Reisdrink nach 4-6 h

Kultivierungszeit [h]	RD <sub>BW</sub>	RD <sub>WCO</sub>
4	süß, Getreide, runder Geschmack	süßer*, weniger Getreide*, intensiver*
5	süß, Getreide	süßer*, wenig Getreide
6	süß, Getreide	süß, Getreide, fruchtig

BW: Blindwert, \*: im Vergleich zum Blindwert

Tabelle 7.78: Gustatorische Bewertung der Kultivierung von *W. cocos* mit ungehopfter Bierwürze nach 4-6 und 25- 27 h

Kultivierungszeit [h]	BWZ <sub>BW</sub>	WCO <sub>BWZu</sub>
4	süß, Malz, würzig	süß, sauer, Fruchtschale, bitter
5	süß, Malz, würzig	stark Pilz
6	süß, Malz, würzig	süß, Pilz, blumig
25	süß, Malz, würzig	blumig, Zitrone, süß, Honig, Tee, herb
26	süß, Malz, würzig	blumig, Zitrone, süß, parfümiert, Blüten, adstringierend
27	süß, säuerlich, Malz	blumig, Zitrone, süß, parfümiert, Blüten, bitter

BW: Blindwert

### Bierwürze (Nullwert, 0 h)

Im Folgenden werden nur Massenspektren der Substanzen aufgeführt, die noch nicht gezeigt wurden.

Abundance

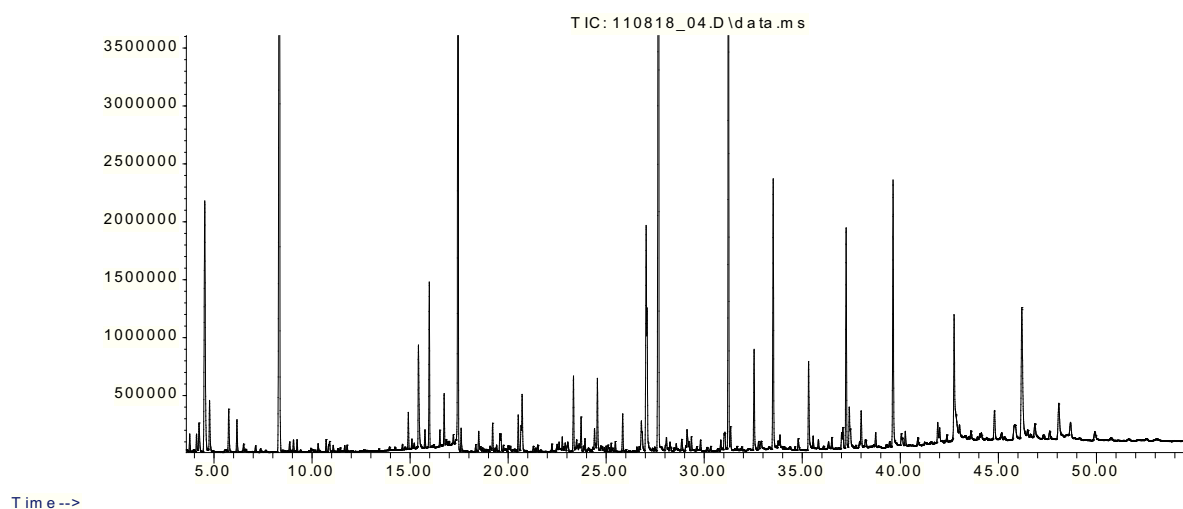


Abbildung 7.87: GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) des flüssig/flüssig Extraktes von ungehopfter Bierwürze (Nullwert, 0 h)

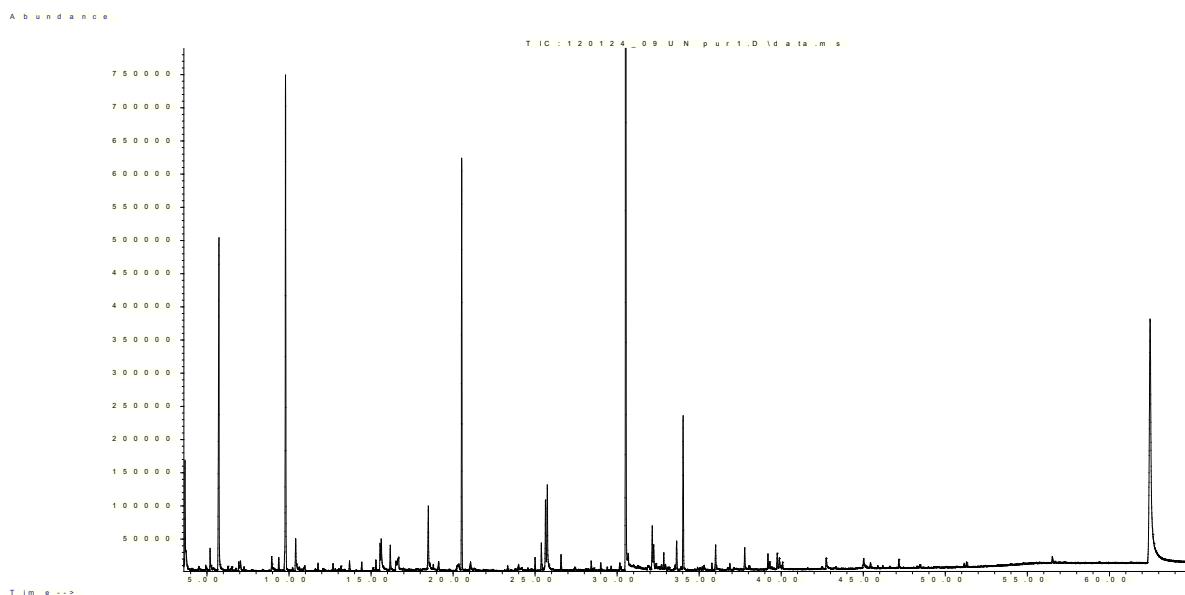


Abbildung 7.88: GC/MS-Chromatogramm (DB-5MS) des flüssig/flüssig Extraktes von ungehopfter Bierwürze (Nullwert, 0 h)

Tabelle 7.79: Massenspektren von Propan-1-ol und Buttersäure (ungehopfte Bierwürze, Substratnullwert, 0 h) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)

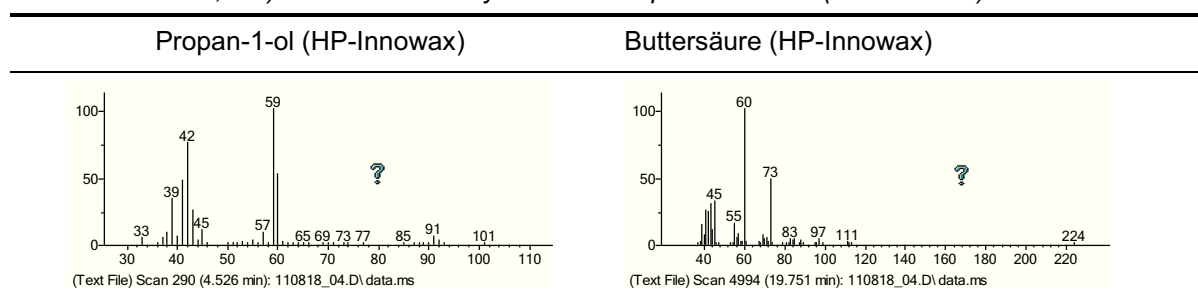
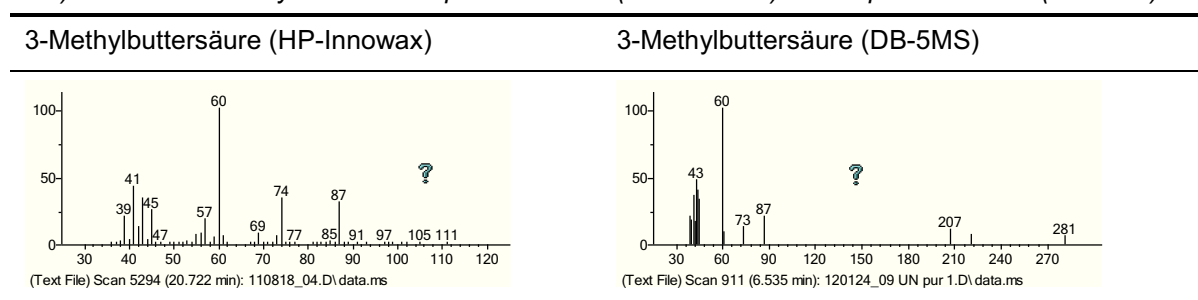


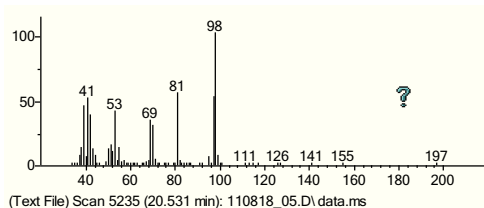
Tabelle 7.80: Massenspektren von 3-Methylbuttersäure (ungehopfte Bierwürze, Substratnullwert, 0 h) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax) und unpolaren Säule (DB-5MS)



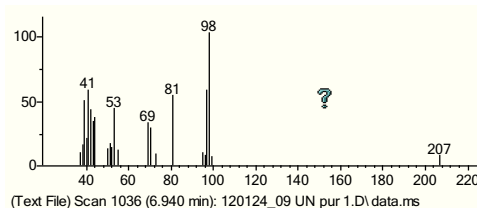


**Tabelle 7.81:** Massenspektren von 2-Furanmethanol (ungehopfte Bierwürze, Substratnullwert, 0 h) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax) und unpolaren Säule (DB-5MS)

## 2-Furanmethanol (HP-Innowax)

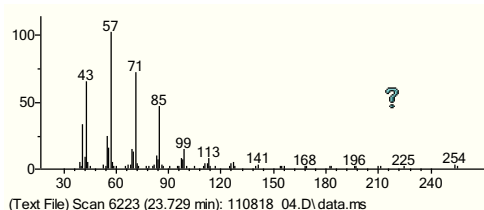


## 2-Furanmethanol (DB-5MS)

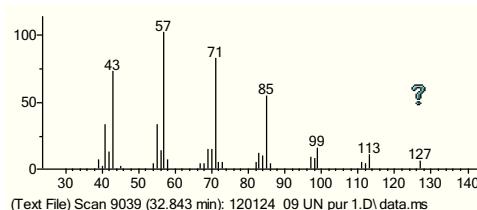


**Tabelle 7.82:** Massenspektren von n-Octadecan (ungehopfte Bierwürze, Substratnullwert, 0 h) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax) und unpolaren Säule (DB-5MS)

## n-Octadecan (HP-Innowax)

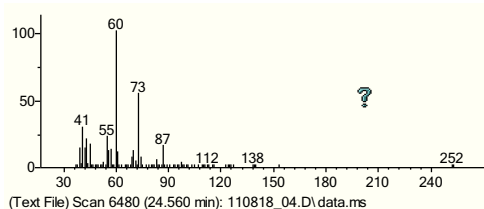


## n-Octadecan (DB-5MS)

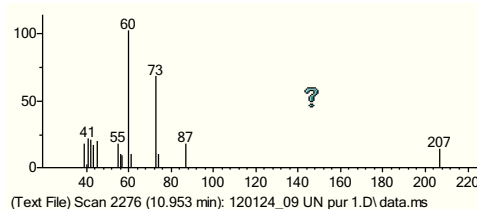


**Tabelle 7.83:** Massenspektren von Capronsäure (ungehopfte Bierwürze, Substratnullwert, 0 h) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax) und unpolaren Säule (DB-5MS)

## Capronsäure (HP-Innowax)

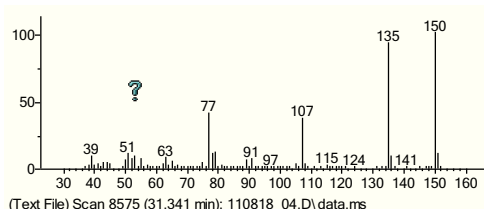


## Capronsäure (DB-5MS)

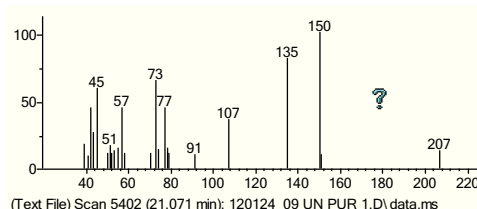


**Tabelle 7.84:** Massenspektren von 4-Vinylguaiacol (ungehopfte Bierwürze, Substratnullwert, 0 h) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax) und einer unpolaren Säule (DB-5MS)

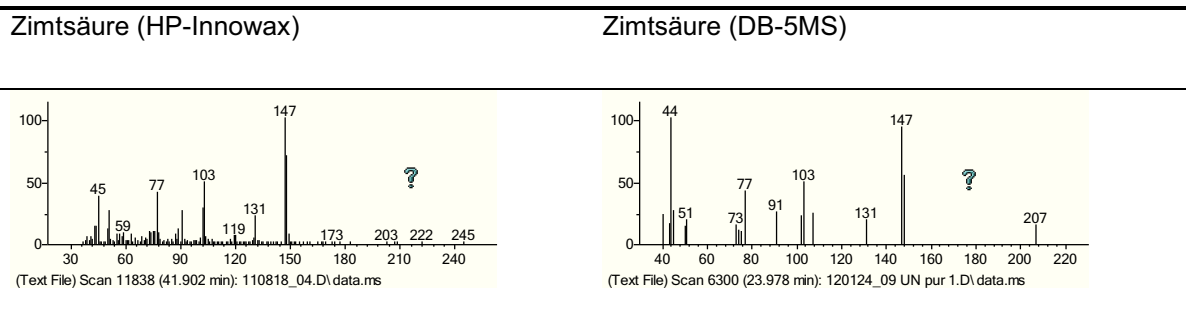
## 4-Vinylguaiacol (HP-Innowax)



## 4-Vinylguaiacol (DB-5MS)

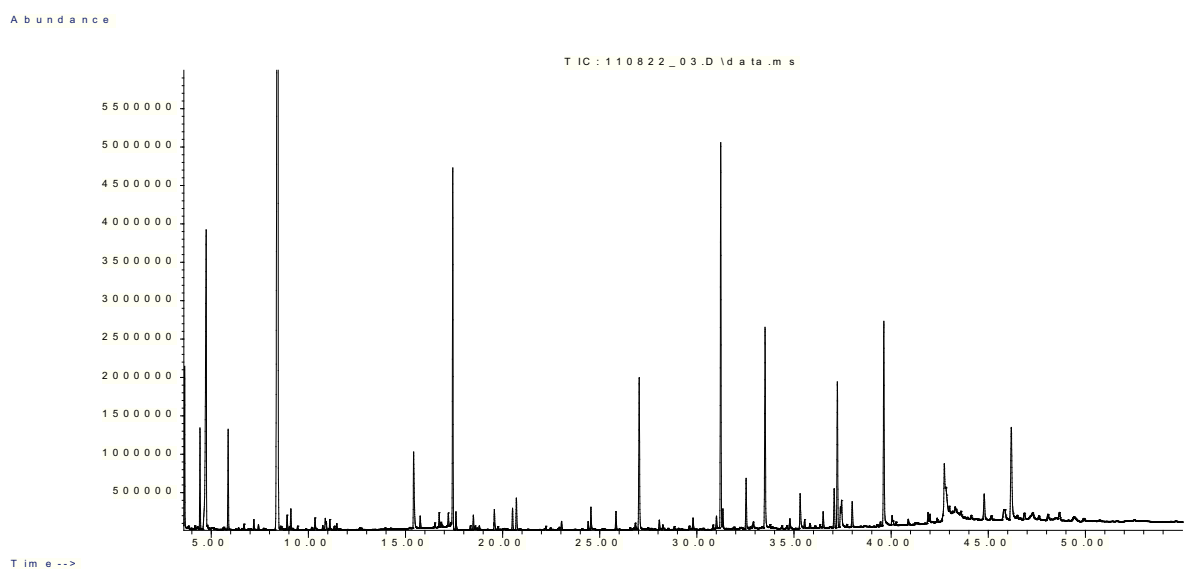


*Tabelle 7.85: Massenspektren von Zimtsäure (ungehopfte Bierwürze, Substratnullwert, 0 h) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax) und einer unpolaren Säule (DB-5MS)*



### Bierwürze (Substratblindwert 7 h)

Im Folgenden werden nur Massenspektren der Substanzen aufgeführt, die noch nicht gezeigt wurden.



*Abbildung 7.89: GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) des flüssig/flüssig Extraktes von ungehopfter Bierwürze (7 h, Substratblindwert)*

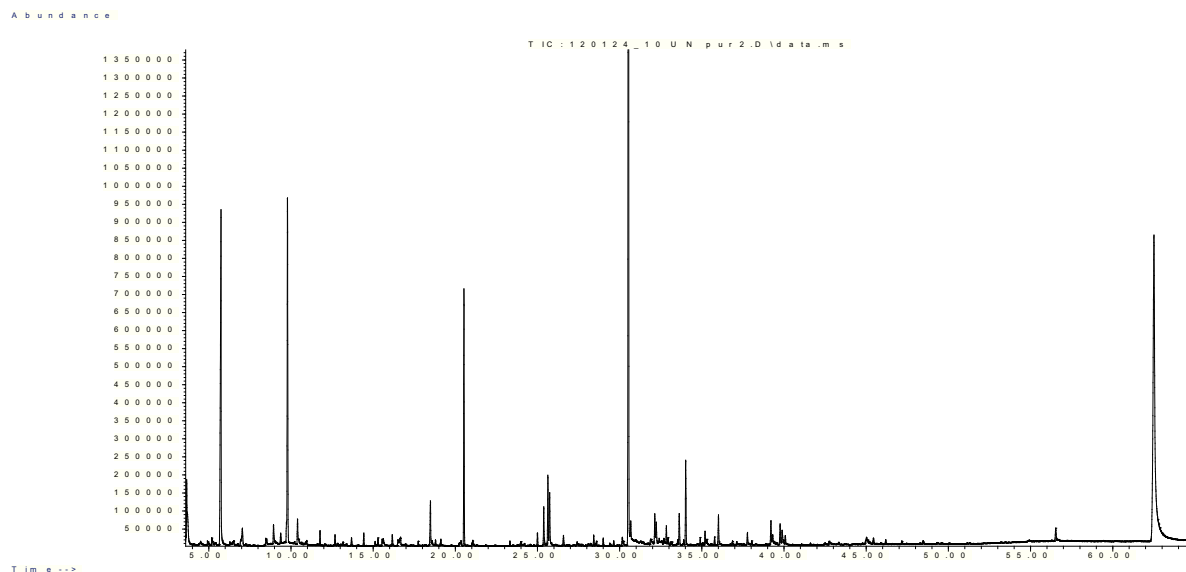


Abbildung 7.90: GC/MS-Chromatogramm (DB-5MS) des flüssig/flüssig Extraktes von ungehopfter Bierwürze (7 h, Substratblindwert)

Tabelle 7.86: Massenspektren von Maltol (ungehopfte Bierwürze, Substratblindwert 7 h) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax) und einer unpolaren Säule (DB-5MS)

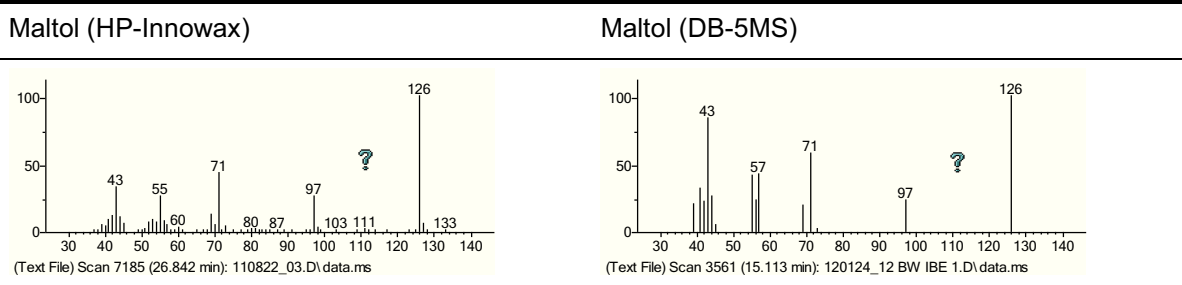
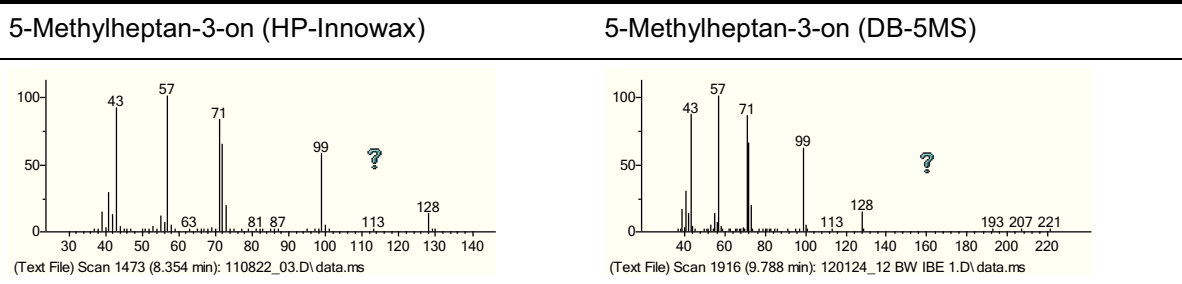


Tabelle 7.87: Massenspektren von 5-Methylheptan-3-on (ungehopfte Bierwürze, Substratblindwert 7 h) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax) und einer unpolaren Säule (DB-5MS)



### Fermentation von ungehopfter Bierwürze durch *I. benzoinum*

Im Folgenden werden nur Massenspektren der Substanzen aufgeführt, die noch nicht gezeigt wurden.

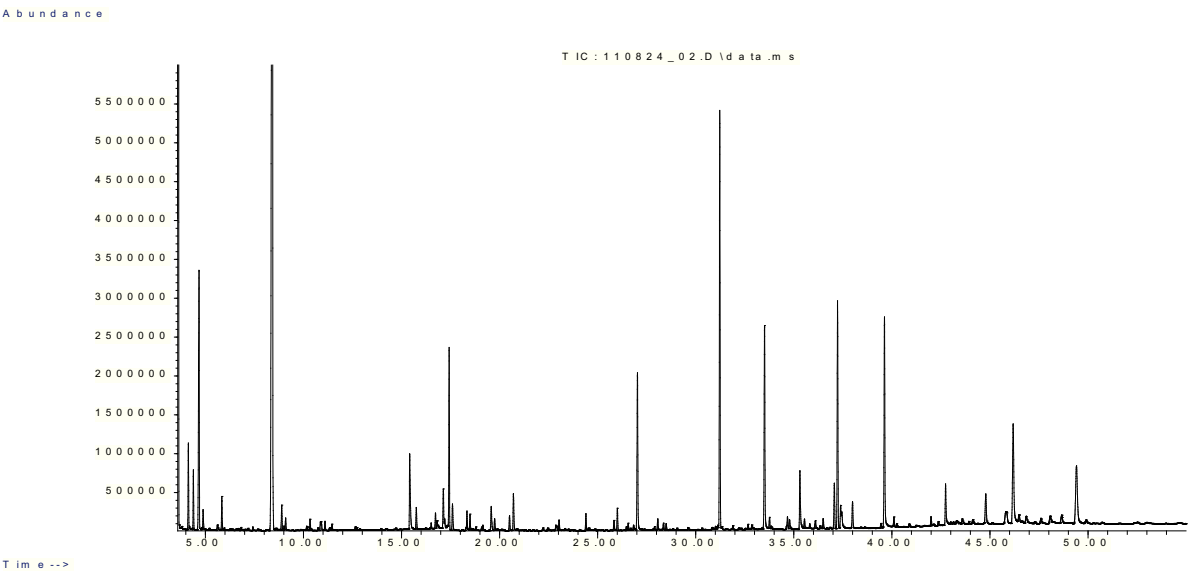


Abbildung 7.91: GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) des flüssig/flüssig Extraktes der Kultivierung von *I. benzoinum* mit ungehopfter Bierwürze (7 h)

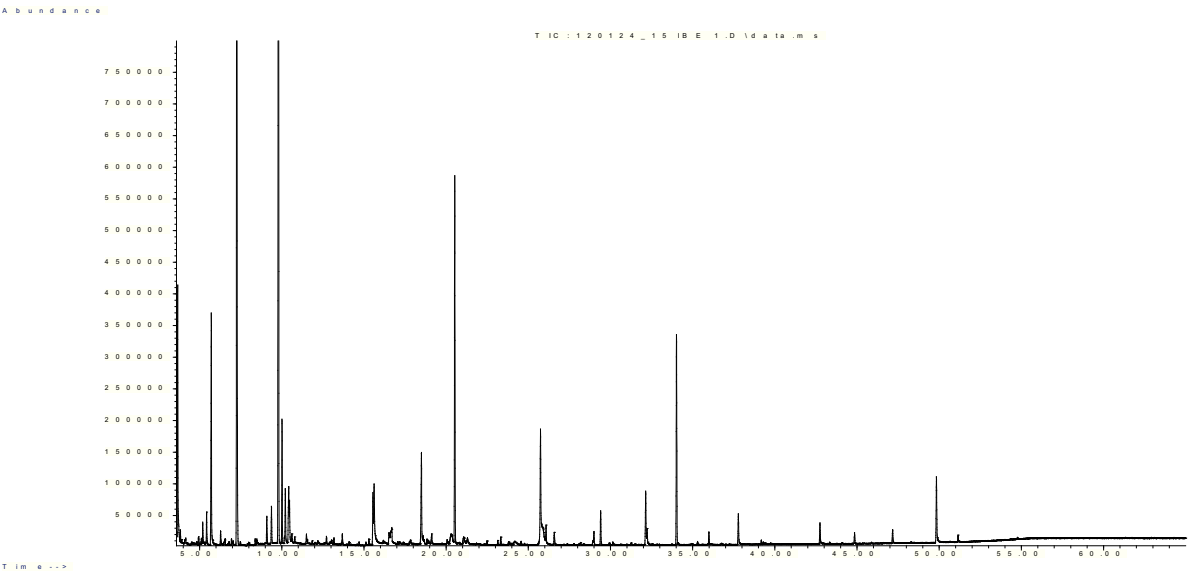
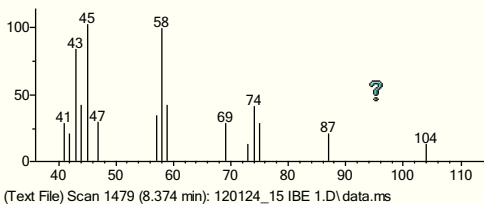
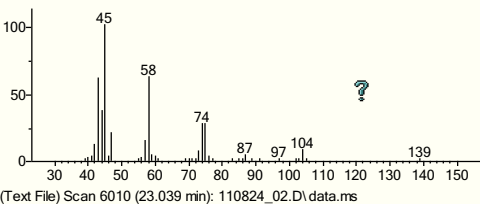


Abbildung 7.92: GC/MS-Chromatogramm (DB-5MS) des flüssig/flüssig Extraktes der Kultivierung von *I. benzoinum* mit ungehopfter Bierwürze (7 h)

Tabelle 7.88: Massenspektren von 1,4-Dioxan-2-ol (Kultivierung von *I. benzoinum* mit ungehopfter Bierwürze, 7 h) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax) und einer unpolaren Säule (DB-5MS)

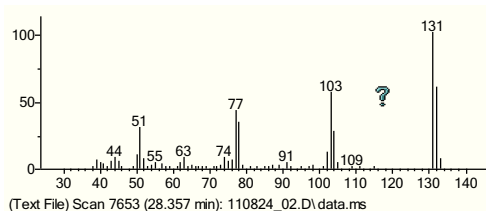
1,4-Dioxan-2-ol (HP-Innowax)

1,4-Dioxan-2-ol (DB-5MS)

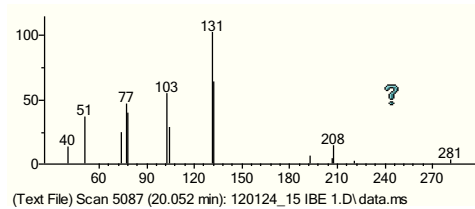


**Tabelle 7.89:** Massenspektren von Zimtaldehyd (Kultivierung von *I. benzoinum* mit ungehopfter Bierwürze, 7 h) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax) und einer unpolaren Säule (DB-5MS)

#### Zimtaldehyd (HP-Innowax)

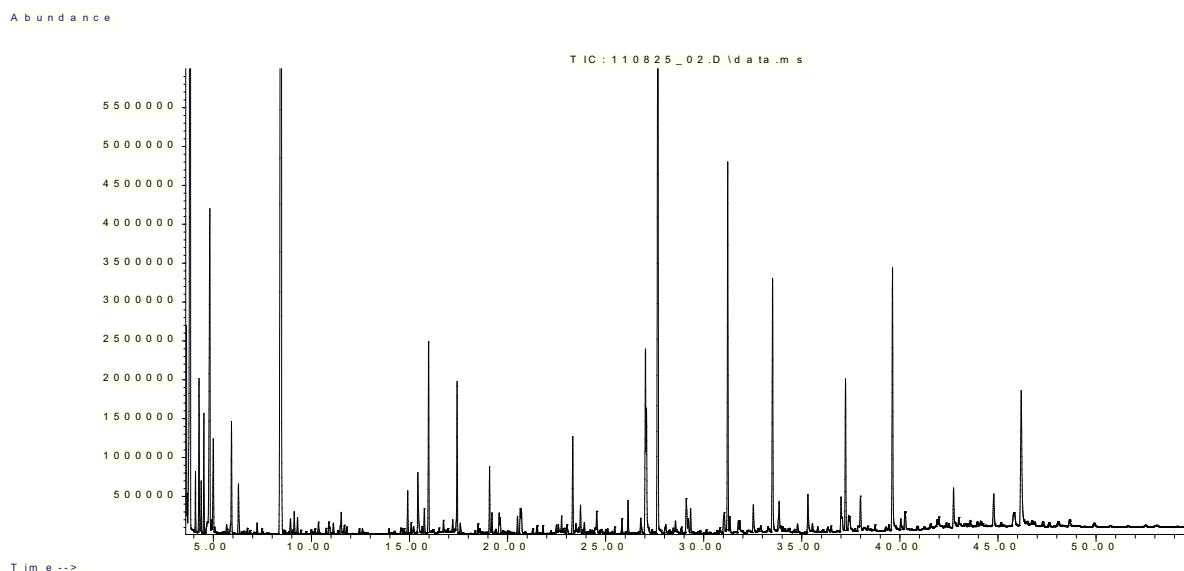


#### Zimtaldehyd (DB-5MS)



### ungehopfte Bierwürze (Substratblindwert 17 h)

Im Folgenden werden nur Massenspektren der Substanzen aufgeführt, die noch nicht gezeigt wurden.



**Abbildung 7.93:** GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) des flüssig/flüssig Extraktes von ungehopfter Bierwürze (17 h, Substratblindwert)

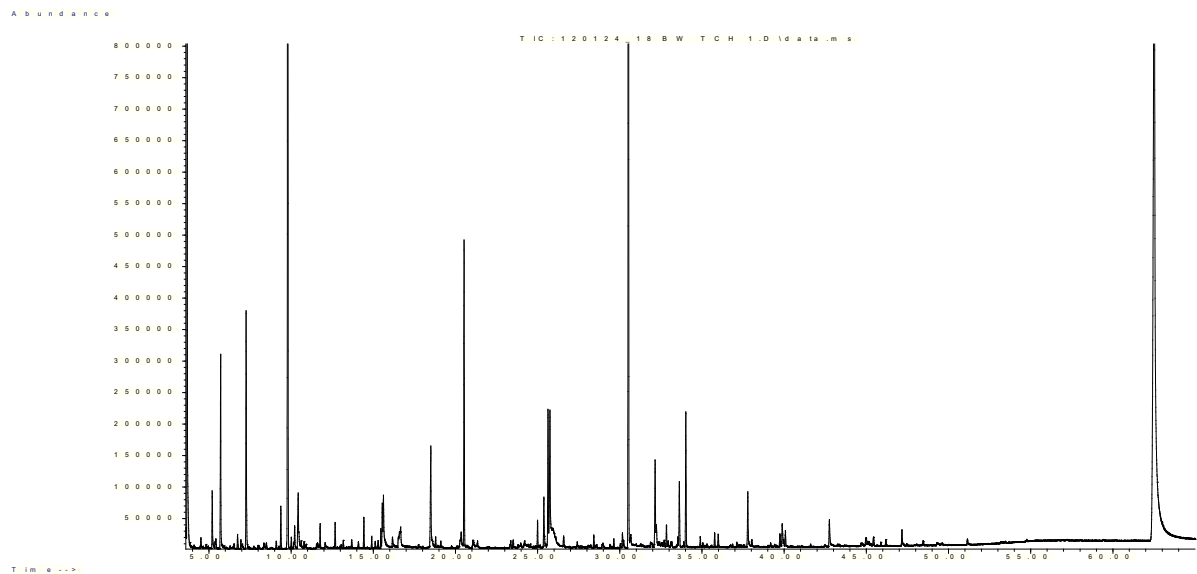


Abbildung 7.94: GC/MS-Chromatogramm (DB-5MS) des flüssig/flüssig Extraktes von ungehopfter Bierwürze (17 h, Substratblindwert)

Tabelle 7.90: Massenspektren von 2-Ethyl-2-methyl-1,3-dioxolan (ungehopfte Bierwürze, Substratblindwert, 17 h) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax) und einer unpolaren Säule (DB-5MS)

2-Ethyl-2-methyl-1,3-dioxolan (HP-Innowax)	2-Ethyl-2-methyl-1,3-dioxolan (DB-5MS)
<p>(Text File) Scan 432 (4.985 min): 110825_02.D\data.ms</p>	<p>(Text File) Scan 495 (5.189 min): 120124_18 BW TCH 1.D\data.ms</p>

**Fermentation von ungehopfter Bierwürze durch *T. chioneus***

Im Folgenden werden nur Massenspektren der Substanzen aufgeführt, die noch nicht gezeigt wurden.

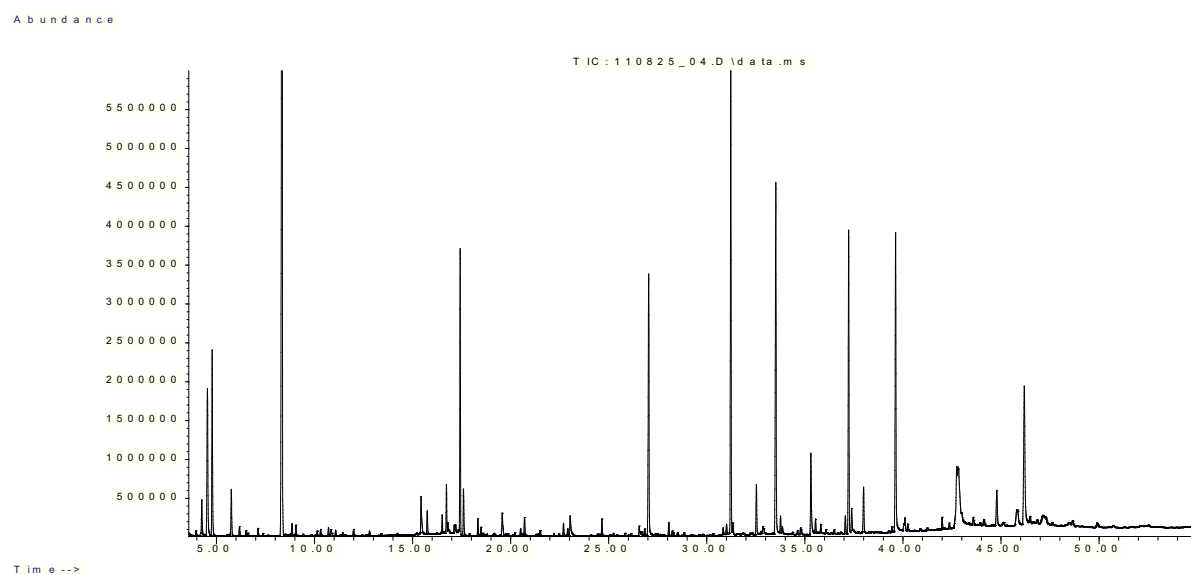


Abbildung 7.95: GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) des flüssig/flüssig Extraktes der Kultivierung von *T. chioneus* mit ungehopfter Bierwürze (17 h)

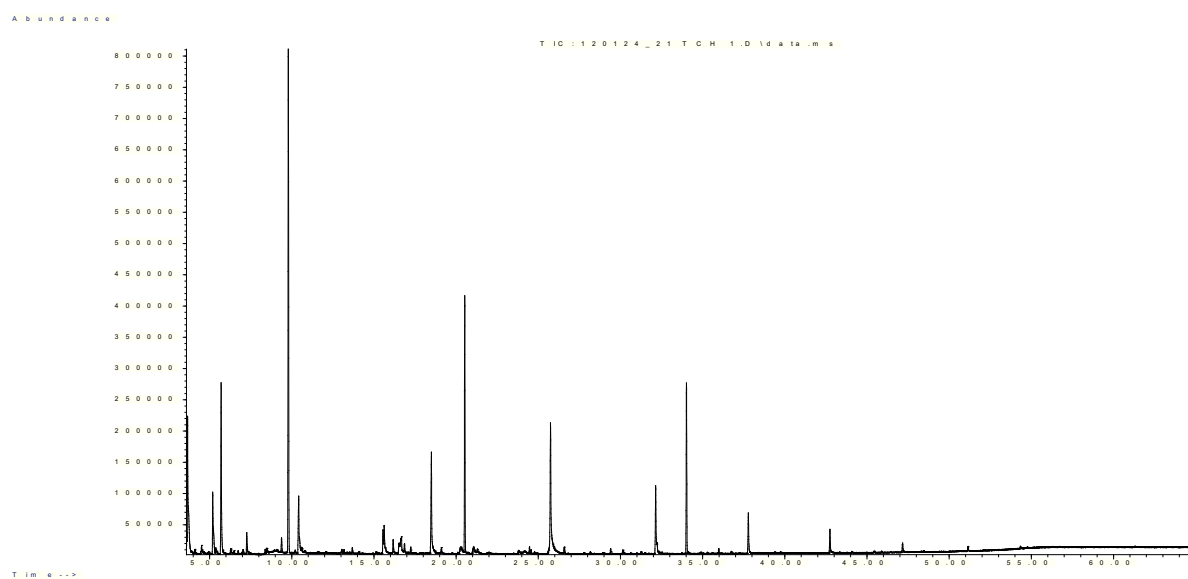
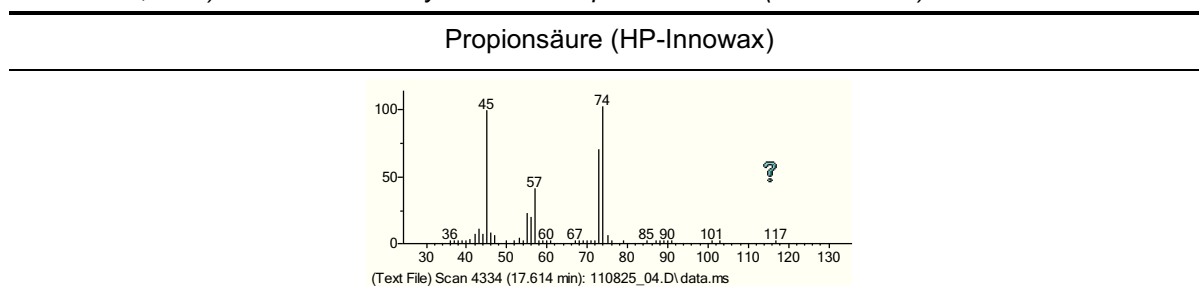
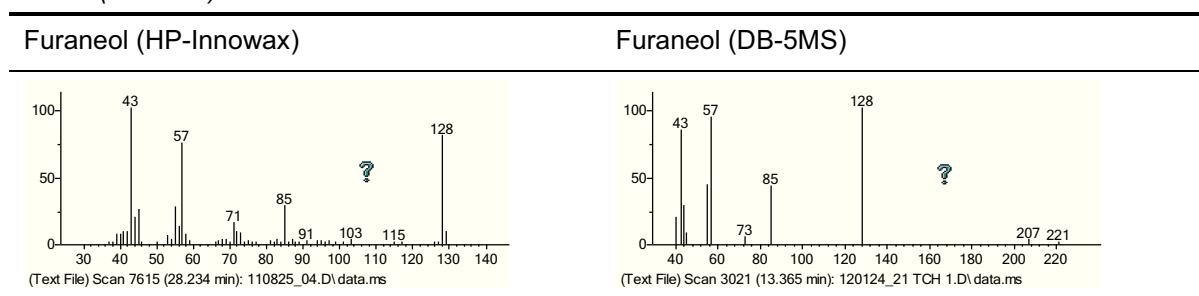


Abbildung 7.96: GC/MS-Chromatogramm (DB-5MS) des flüssig/flüssig Extraktes der Kultivierung von *T. chioneus* mit ungehopfter Bierwürze (17 h)

**Tabelle 7.91:** Massenspektrum von Propionsäure (Kultivierung von *T. chioneus* mit ungehopfter Bierwürze, 17 h) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax)

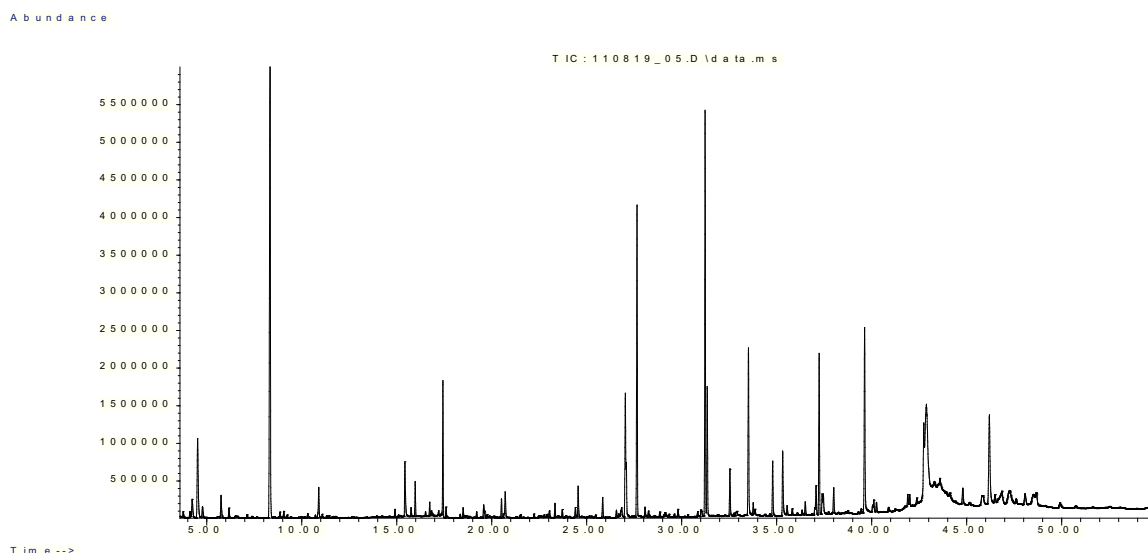


**Tabelle 7.92:** Massenspektren von Furaneol (Kultivierung von *T. chioneus* mit ungehopfter Bierwürze, 17 h) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax) und einer unpolaren Säule (DB-5MS)



### ungehopfte Bierwürze (Substratblindwert 25 h)

Im Folgenden werden nur Massenspektren der Substanzen aufgeführt, die noch nicht gezeigt wurden.



**Abbildung 7.97:** GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) des flüssig/flüssig Extraktes von ungehopfter Bierwürze (25 h, Substratblindwert)



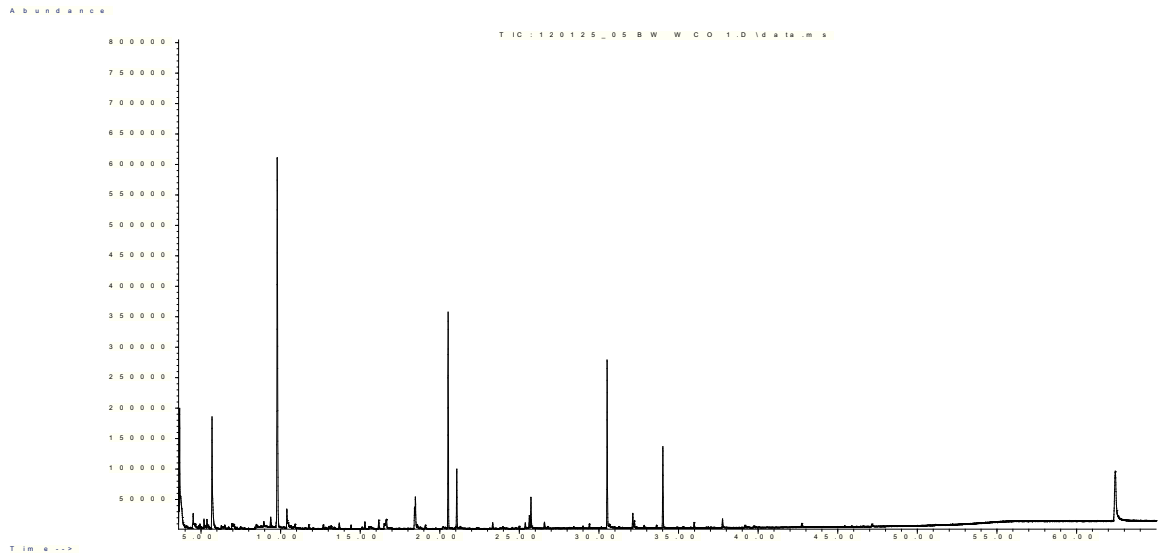


Abbildung 7.98: GC/MS-Chromatogramm (DB-5MS) des flüssig/flüssig Extraktes von ungehopfter Bierwürze (25 h, Substratblindwert)

### Fermentation von ungehopfter Bierwürze durch *W. cocos*

Im Folgenden werden nur Massenspektren der Substanzen aufgeführt, die noch nicht gezeigt wurden.

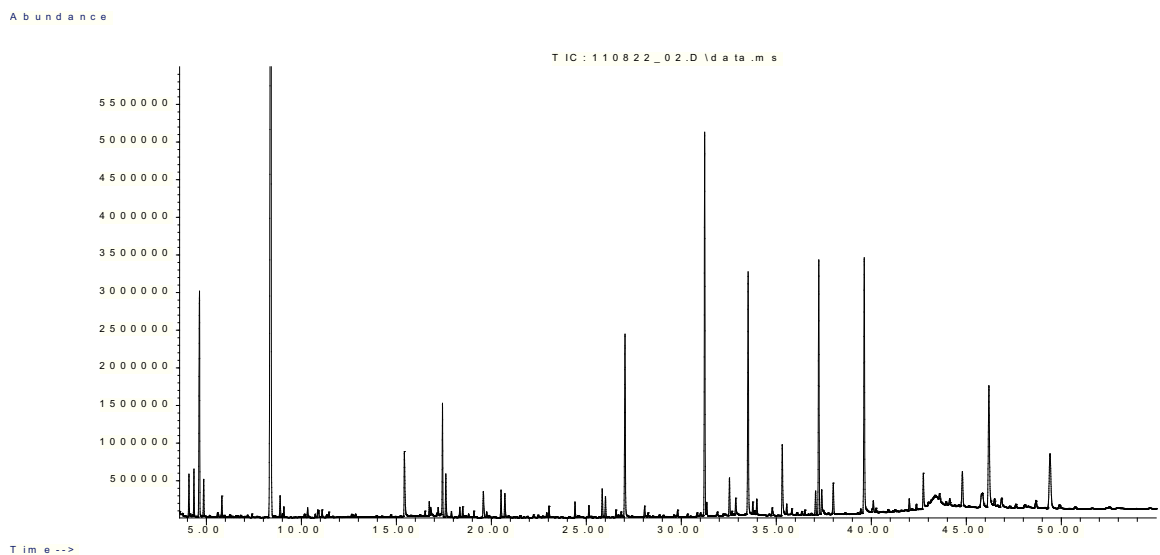


Abbildung 7.99: GC/MS-Chromatogramm (HP-Innowax) des flüssig/flüssig Extraktes der Kultivierung von *W. cocos* mit ungehopfter Bierwürze (25 h)

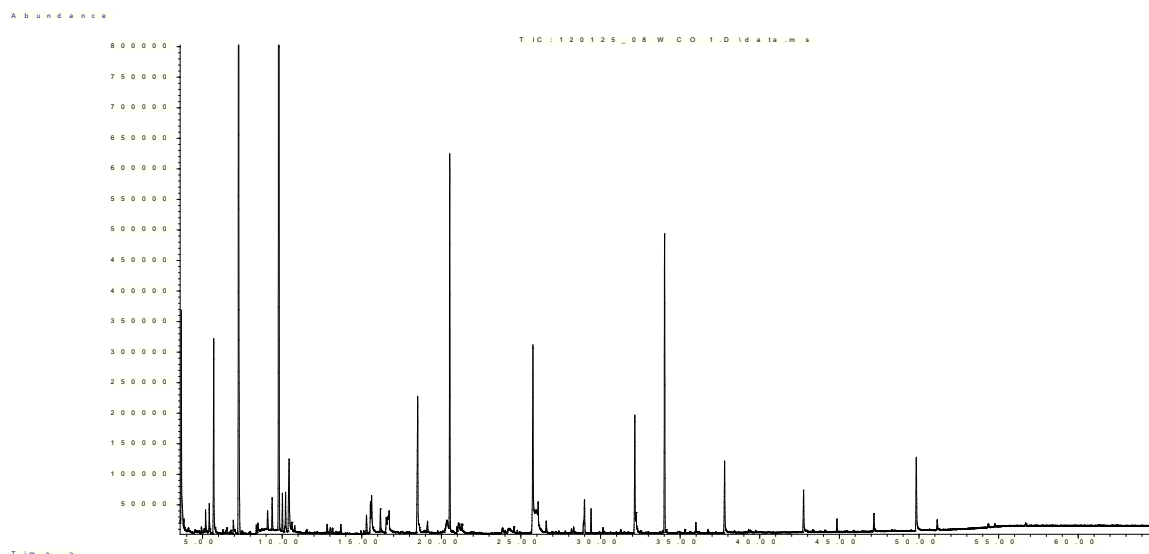
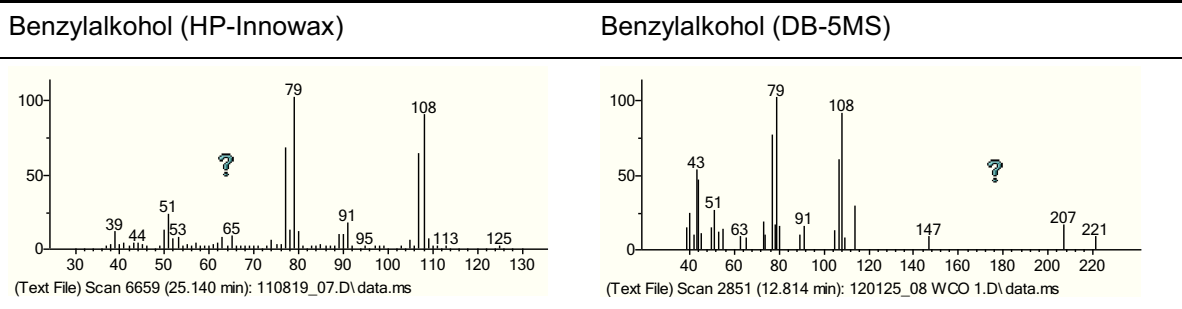


Abbildung 7.100: GC/MS-Chromatogramm (DB-5MS) des flüssig/flüssig Extraktes der Kultivierung von *W. cocos* mit ungehopfter Bierwürze (25 h)

Tabelle 7.93: Massenspektren von Benzylalkohol (Kultivierung von *W. cocos* mit ungehopfter Bierwürze, 25 h) aus GC/MS-Analysen an einer polaren Säule (HP-Innowax) und einer unpolaren Säule (DB-5MS)



### 7.3 Referenzsubstanzen

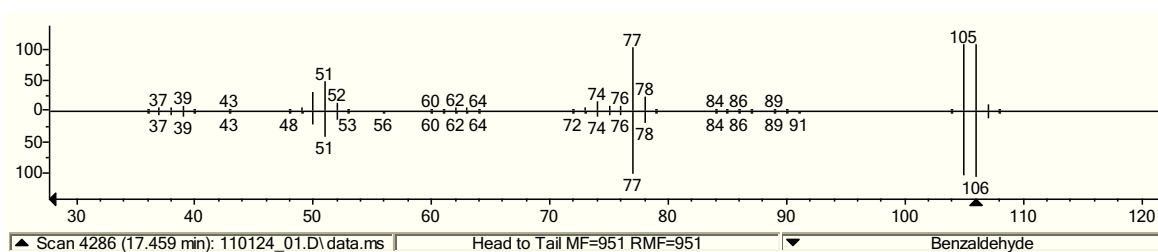


Abbildung 7.101: Massenspektrum des authentischen Standards Benzaldehyd (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

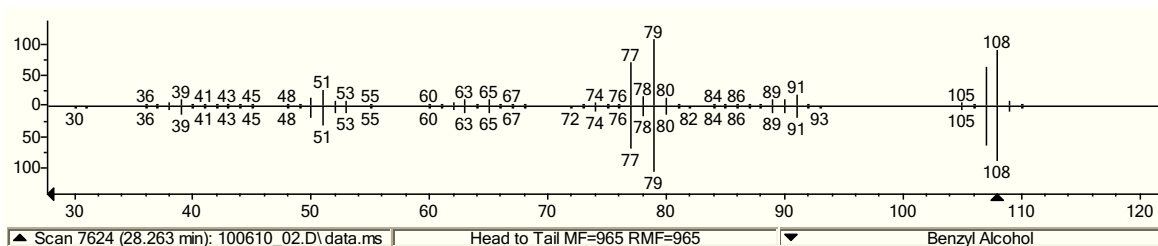


Abbildung 7.102: Massenspektrum des authentischen Standards Benzylalkohol (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

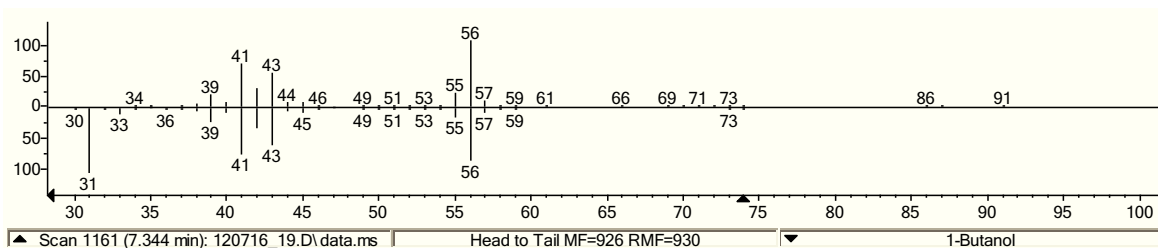


Abbildung 7.103: Massenspektrum des authentischen Standards Butan-1-ol (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

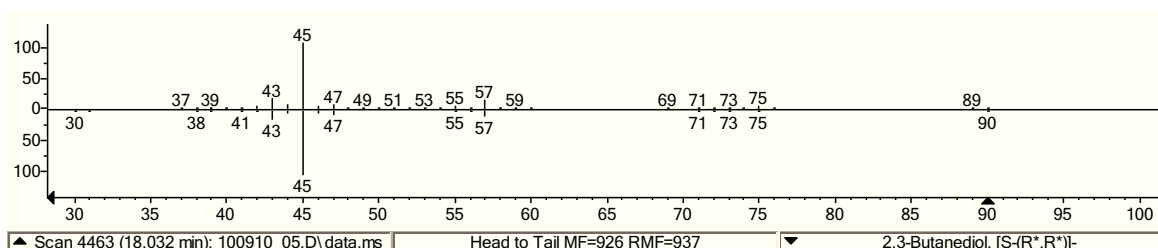


Abbildung 7.104: Massenspektrum des authentischen Standards Butan-2,3-diol (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

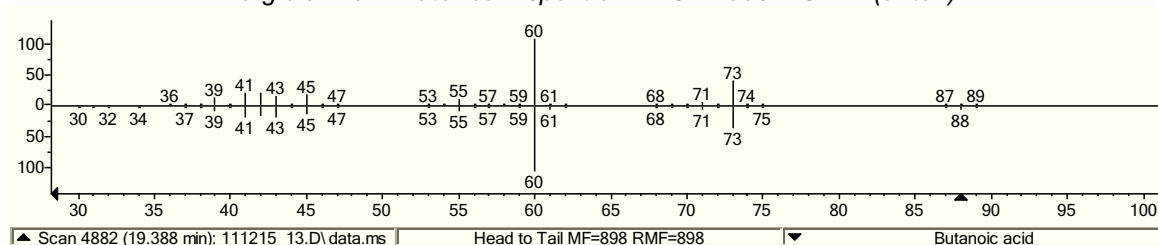


Abbildung 7.105: Massenspektrum des authentischen Standards Buttersäure (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

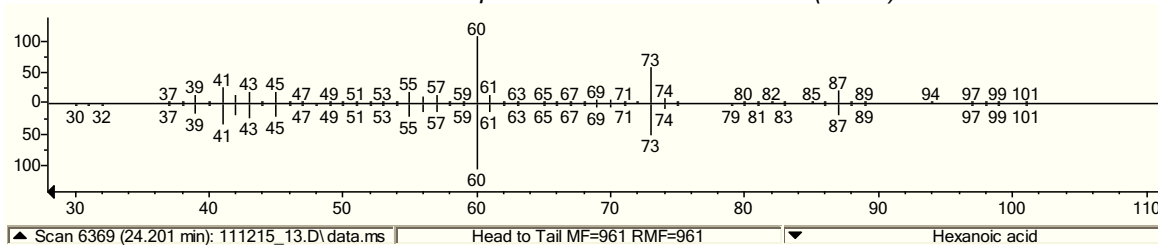


Abbildung 7.106: Massenspektrum des authentischen Standards Capronsäure (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

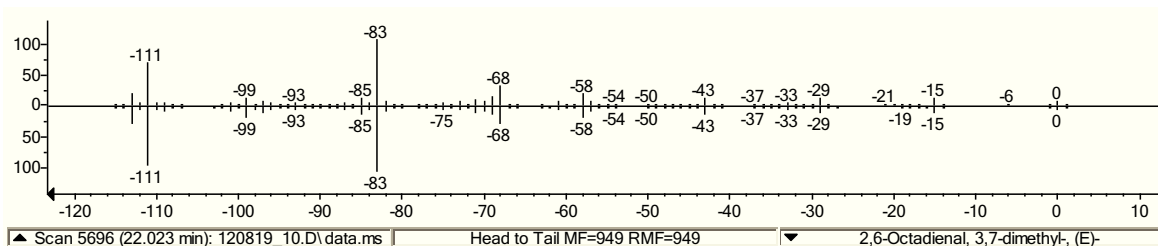


Abbildung 7.107: Massenspektrum des authentischen Standards Citral (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

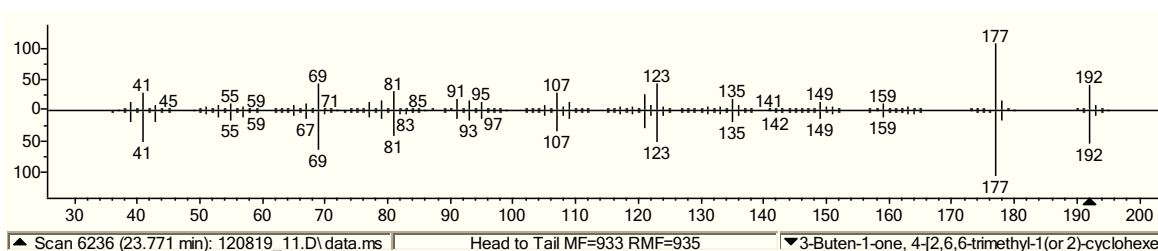


Abbildung 7.108: Massenspektrum des authentischen Standards  $\beta$ -Damascon (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

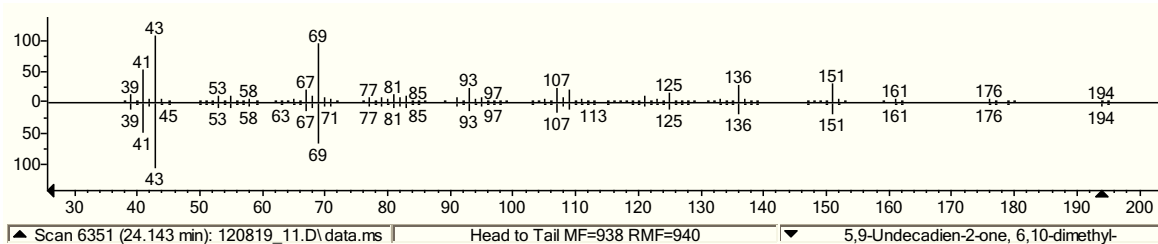


Abbildung 7.109: Massenspektrum des authentischen Standards Dihydropseudoionon (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

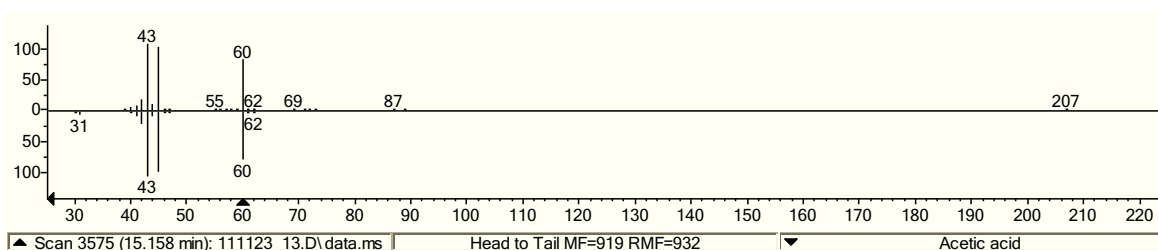


Abbildung 7.110: Massenspektrum des authentischen Standards Essigsäure (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

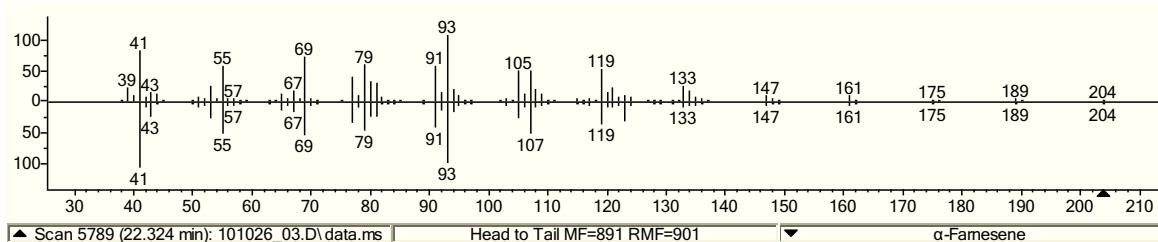


Abbildung 7.111: Massenspektrum des authentischen Standards  $\alpha$ -Farnesen (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

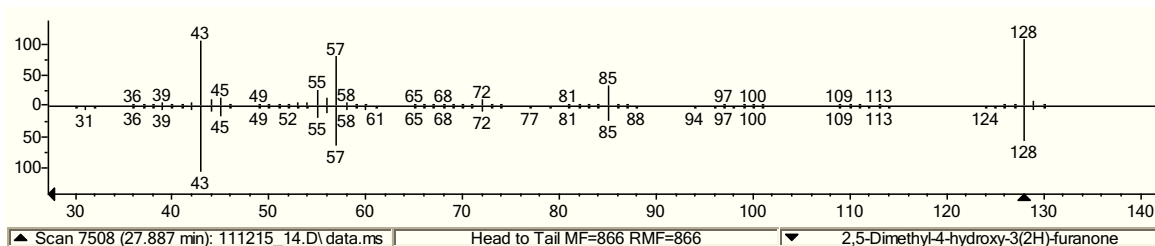


Abbildung 7.112: Massenspektrum des authentischen Standards Furaneol (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

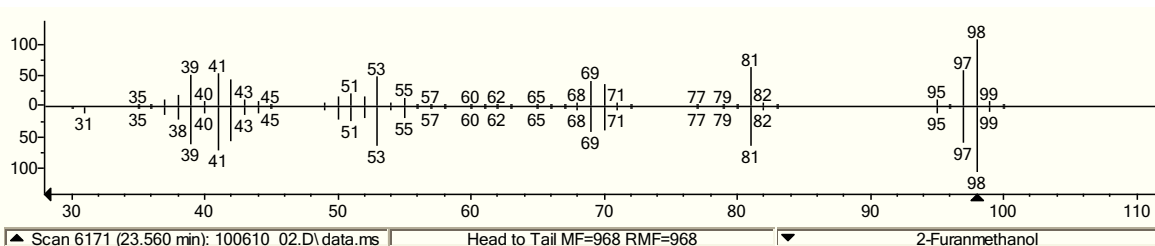


Abbildung 7.113: Massenspektrum des authentischen Standards 2-Furanmethanol (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

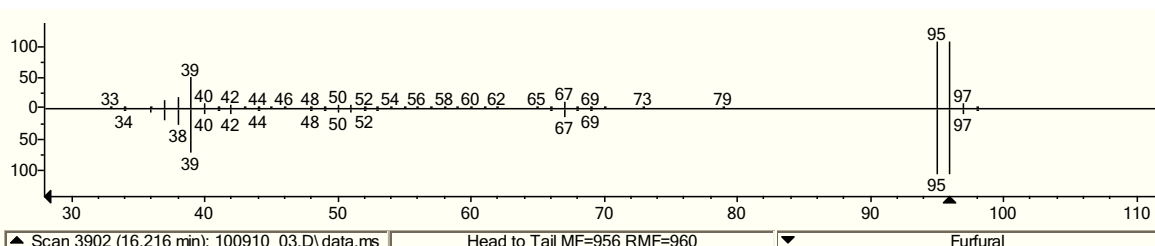


Abbildung 7.114: Massenspektrum des authentischen Standards Furfural (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

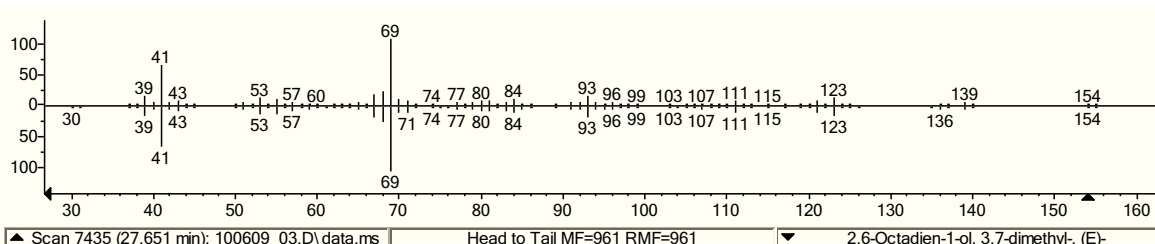


Abbildung 7.115: Massenspektrum des authentischen Standards (E)-Geraniol (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

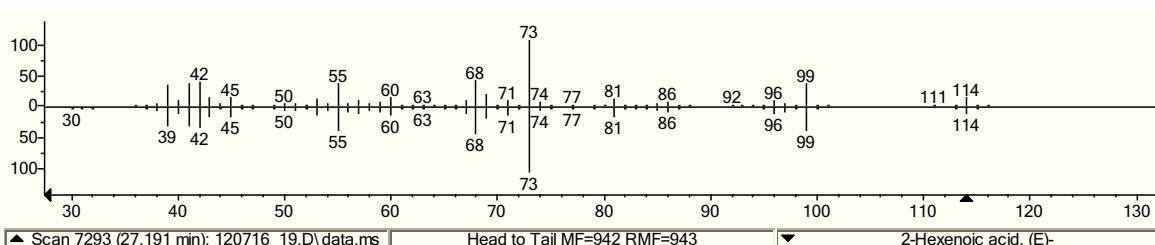


Abbildung 7.116: Massenspektrum des authentischen Standards 2-Hexensäure (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

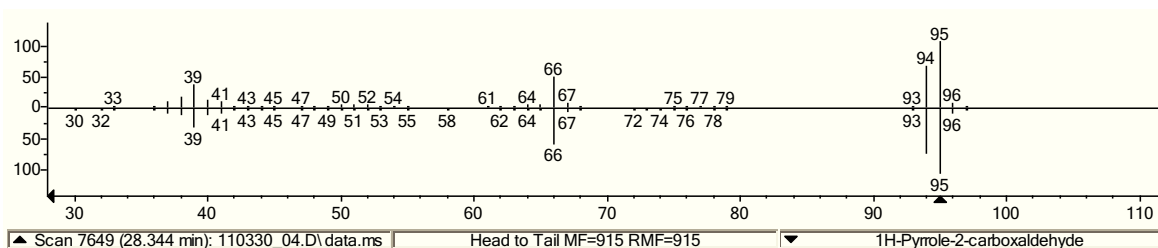


Abbildung 7.117: Massenspektrum des authentischen Standards 1H-Pyrrole-2-carboxaldehyd (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

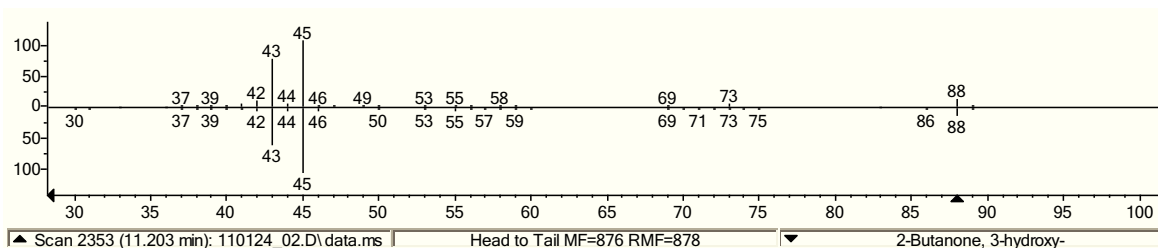


Abbildung 7.118: Massenspektrum des authentischen Standards 3-Hydroxybutan-2-on (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

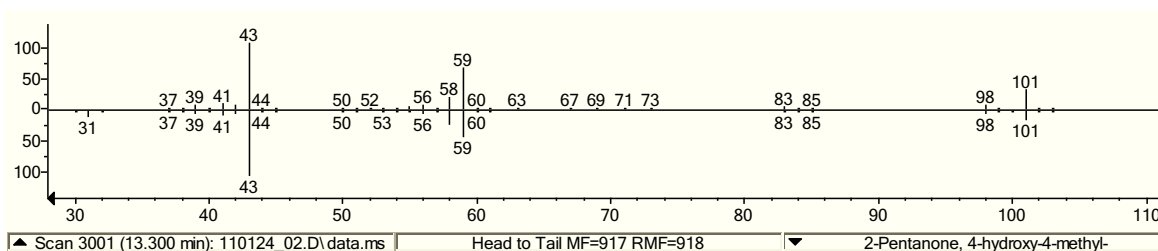


Abbildung 7.119: Massenspektrum des authentischen Standards 4-Hydroxy-4-methylpentan-2-on (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

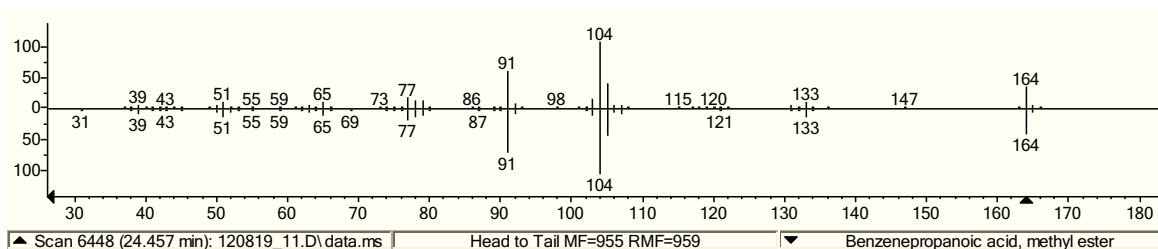


Abbildung 7.120: Massenspektrum des authentischen Standards Hydrozimtsäuremethylester (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

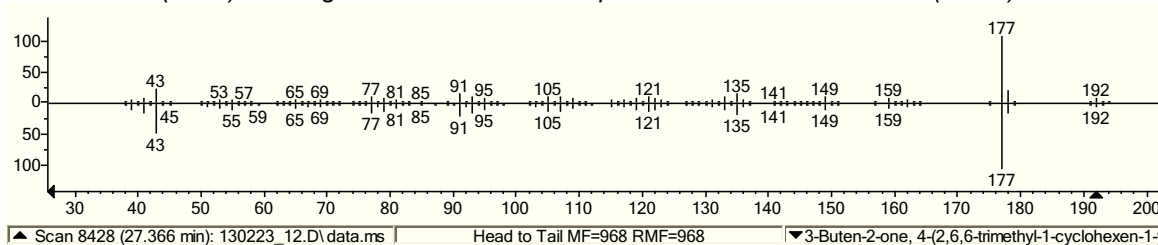


Abbildung 7.121: Massenspektrum des authentischen Standards β-Ionon (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

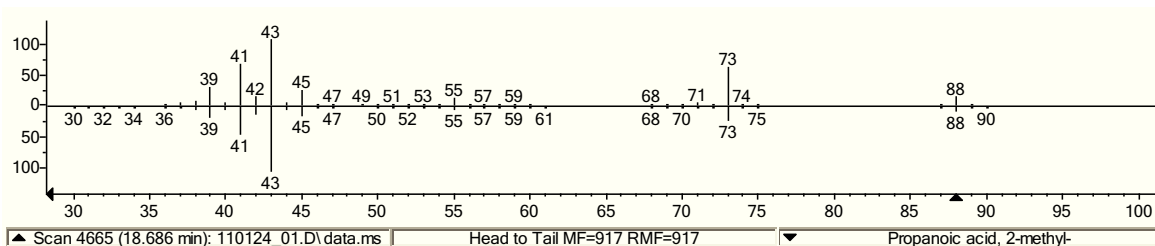


Abbildung 7.122: Massenspektrum des authentischen Standards Isobuttersäure (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

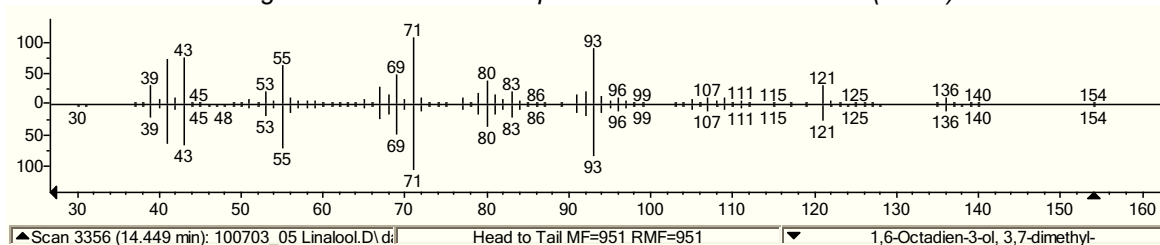


Abbildung 7.123: Massenspektrum des authentischen Standards Linalool (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

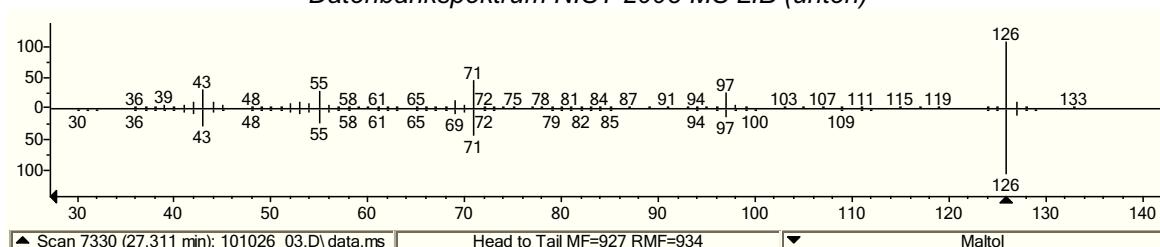


Abbildung 7.124: Massenspektrum des authentischen Standards Maltol (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

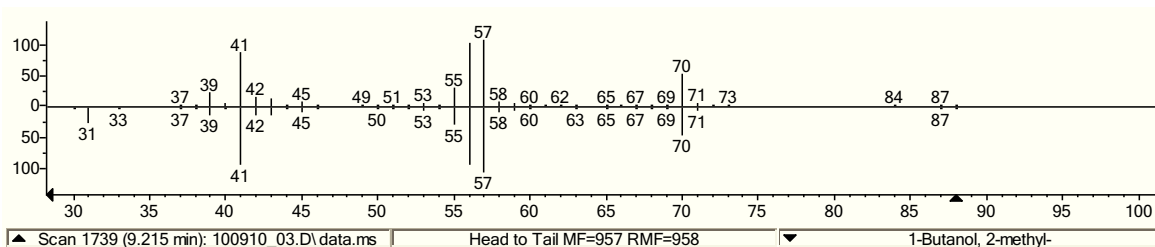


Abbildung 7.125: Massenspektrum des authentischen Standards 2-Methylbutan-1-ol (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

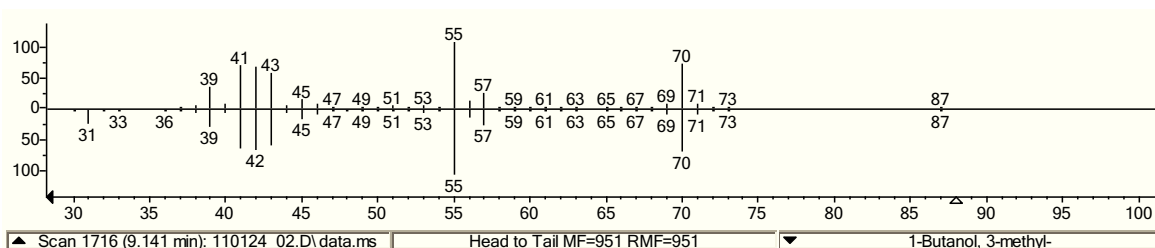


Abbildung 7.126: Massenspektrum des authentischen Standards 3-Methylbutan-1-ol (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

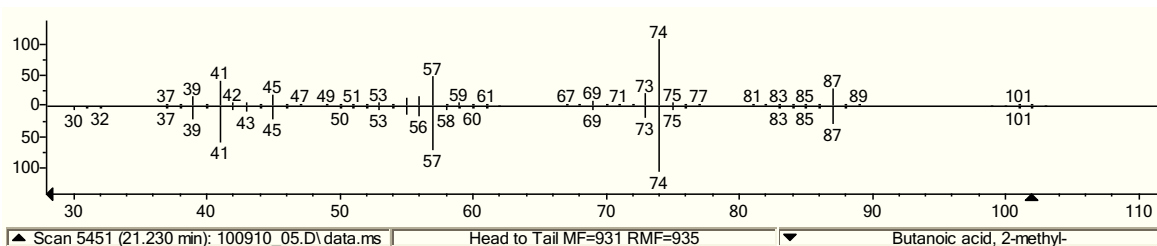


Abbildung 7.127: Massenspektrum des authentischen Standards 2-Methylbuttersäure (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

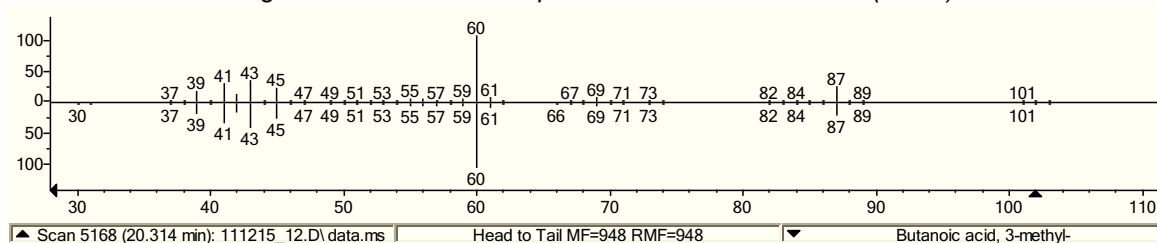


Abbildung 7.128: Massenspektrum des authentischen Standards 3-Methylbuttersäure (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

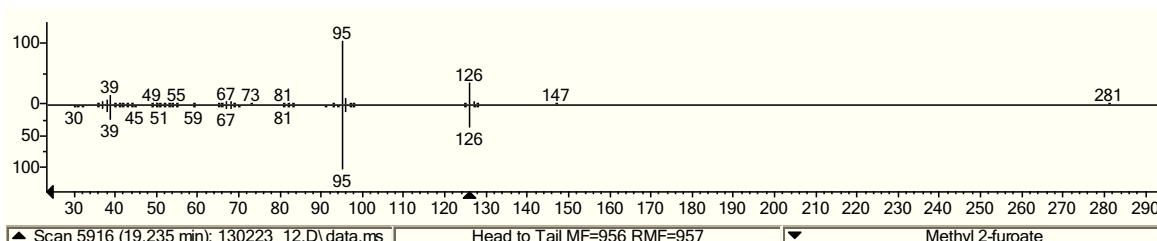


Abbildung 7.129: Massenspektrum des authentischen Standards Methyl-2-furoat (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

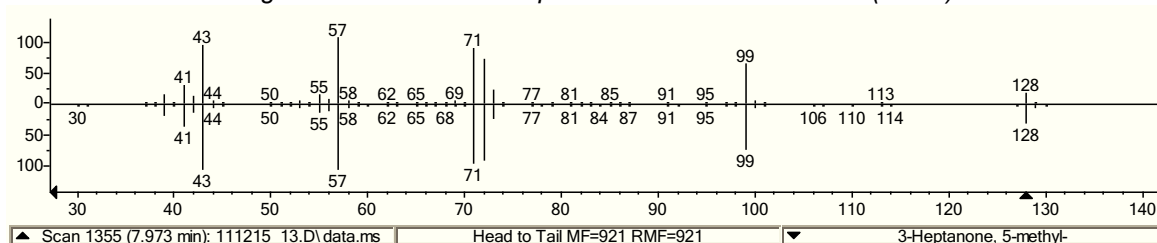


Abbildung 7.130: Massenspektrum des authentischen Standards 5-Methylheptan-3-on (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

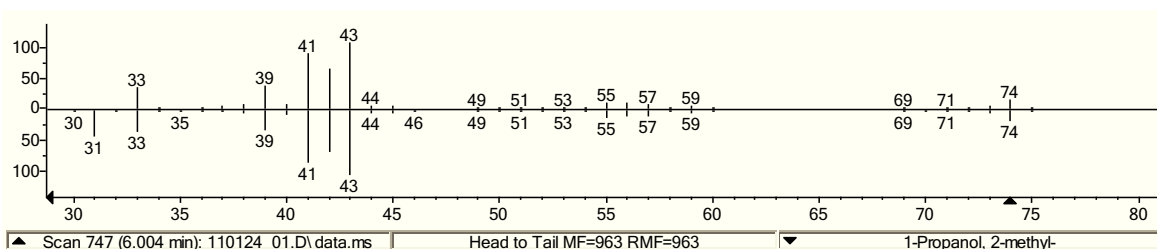


Abbildung 7.131: Massenspektrum des authentischen Standards 2-Methylpropan-1-ol (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)



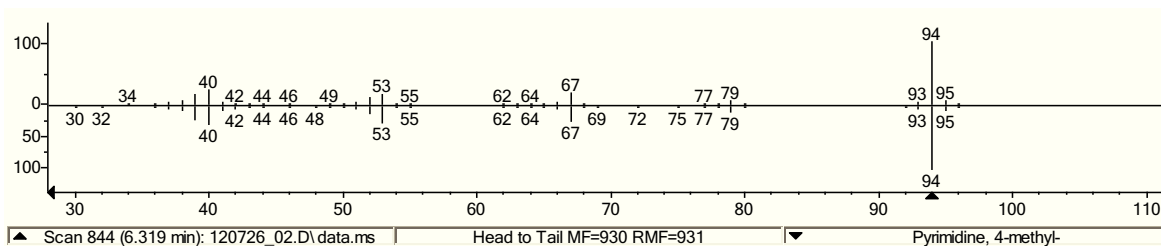


Abbildung 7.132: Massenspektrum des authentischen Standards 4-Methylpyrimidin (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

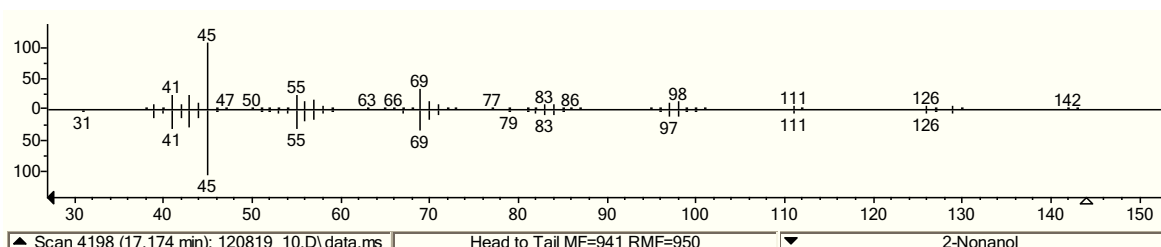


Abbildung 7.133: Massenspektrum des authentischen Standards Nonan-2-ol (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

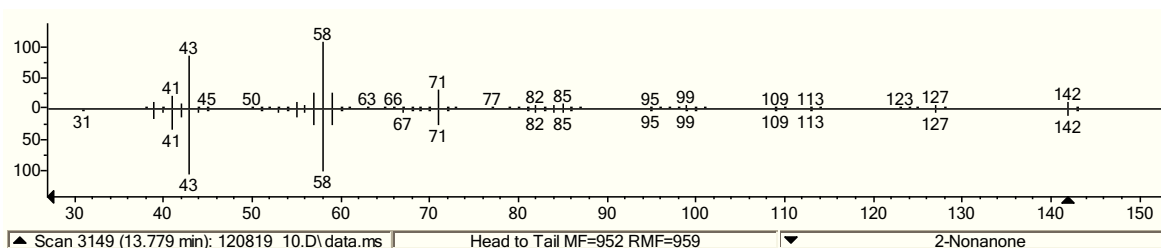


Abbildung 7.134: Massenspektrum des authentischen Standards Nonan-2-on (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

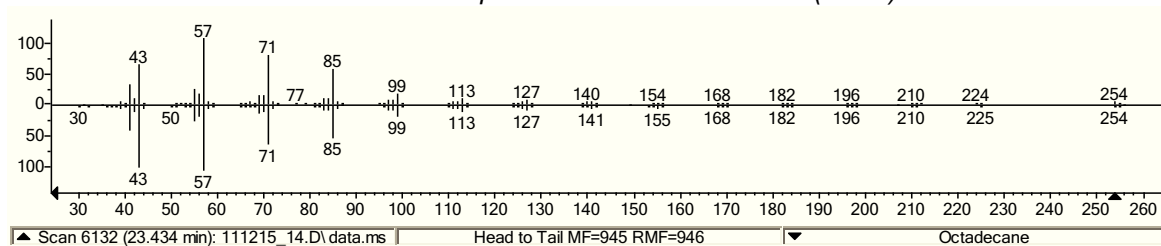


Abbildung 7.135: Massenspektrum des authentischen Standards n-Octadecan (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

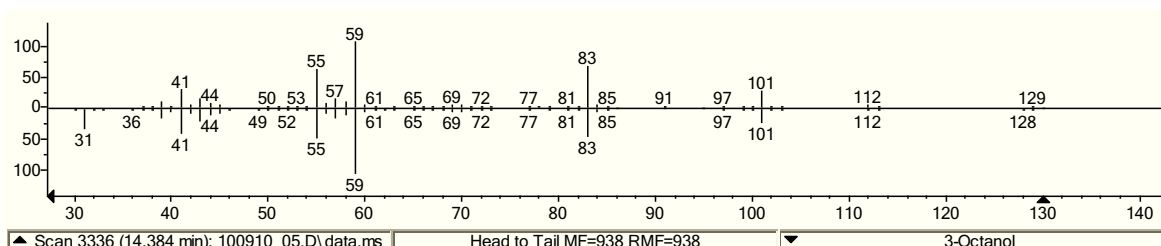


Abbildung 7.136: Massenspektrum des authentischen Standards Octan-3-ol (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

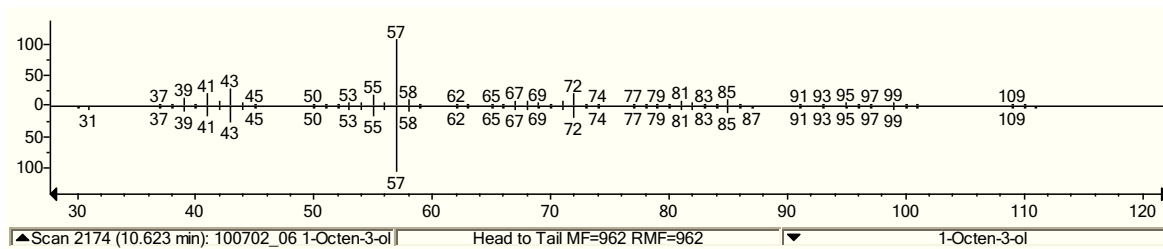


Abbildung 7.137: Massenspektrum des authentischen Standards Oct-1-en-3-ol (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

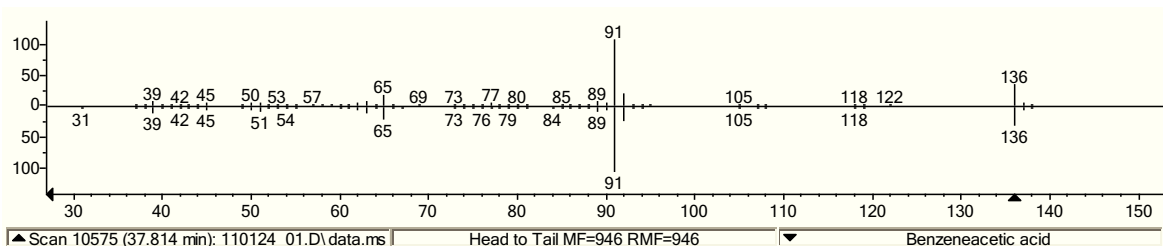


Abbildung 7.138: Massenspektrum des authentischen Standards Phenylacetic acid (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

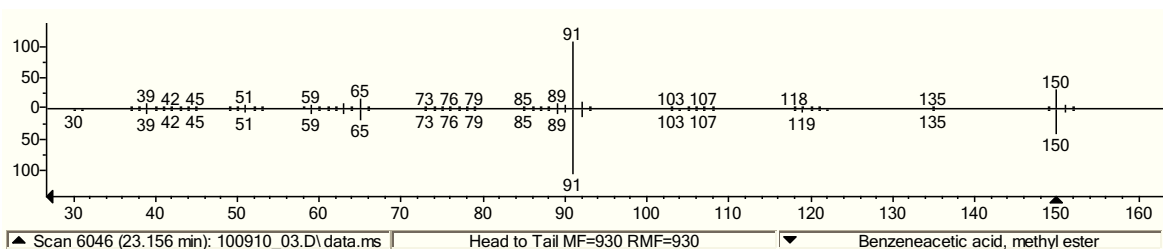


Abbildung 7.139: Massenspektrum des authentischen Standards Phenylacetic acid methyl ester (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

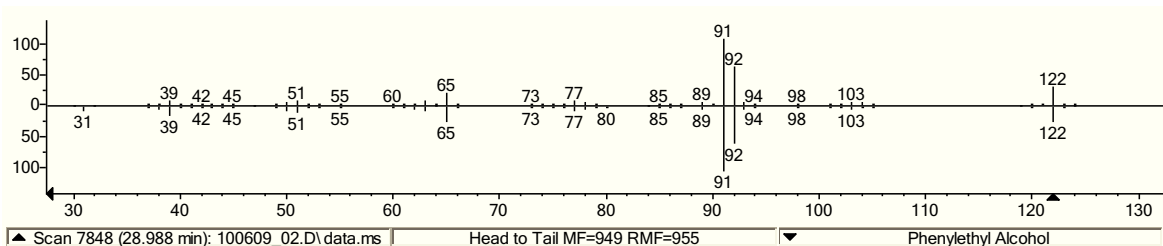


Abbildung 7.140: Massenspektrum des authentischen Standards 2-Phenylethanol (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

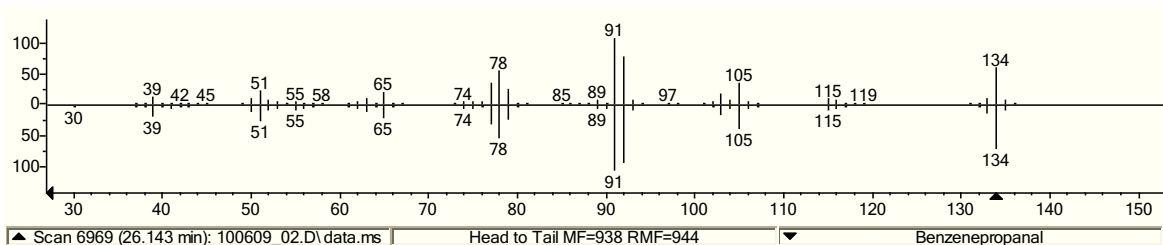


Abbildung 7.141: Massenspektrum des authentischen Standards 3-Phenylpropanal (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

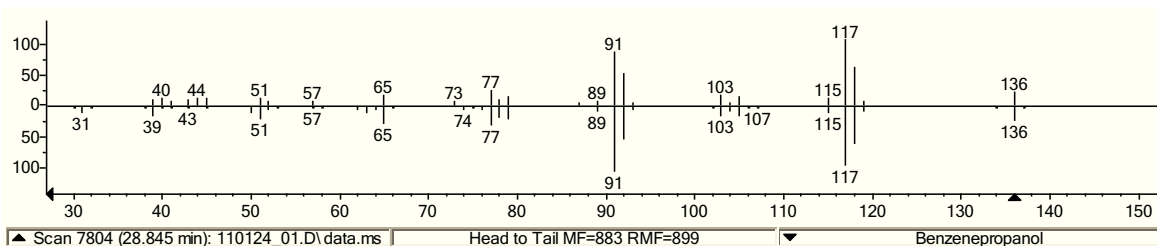


Abbildung 7.142: Massenspektrum des authentischen Standards 3-Phenylpropanol (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

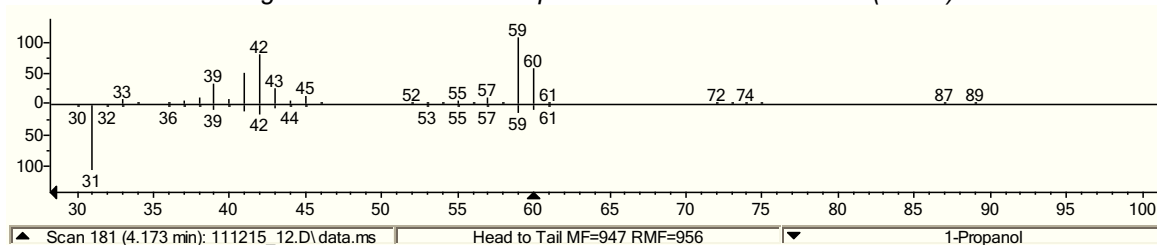


Abbildung 7.143: Massenspektrum des authentischen Standards Propan-1-ol (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

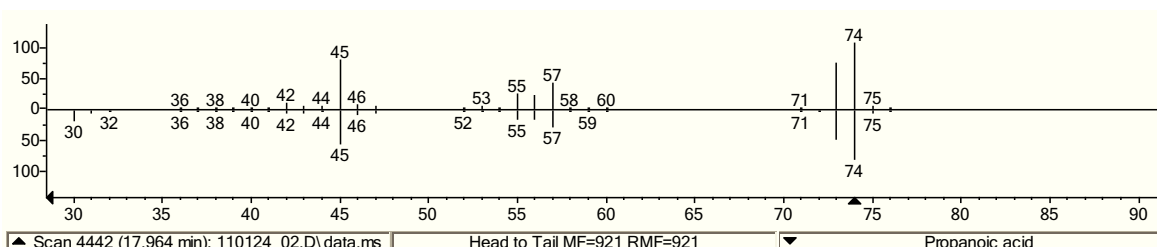


Abbildung 7.144: Massenspektrum des authentischen Standards Propionsäure (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

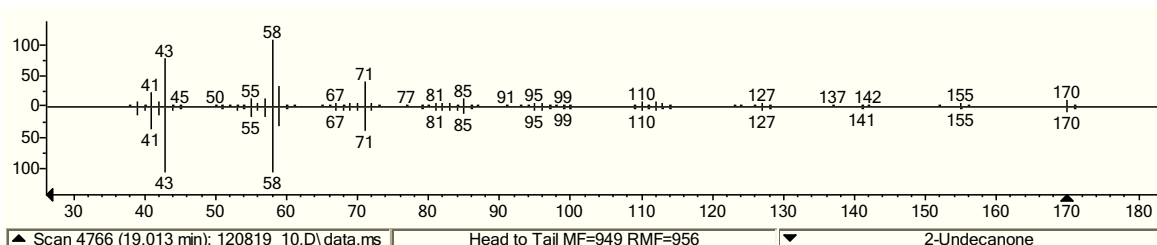


Abbildung 7.145: Massenspektrum des authentischen Standards Undecan-2-on (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

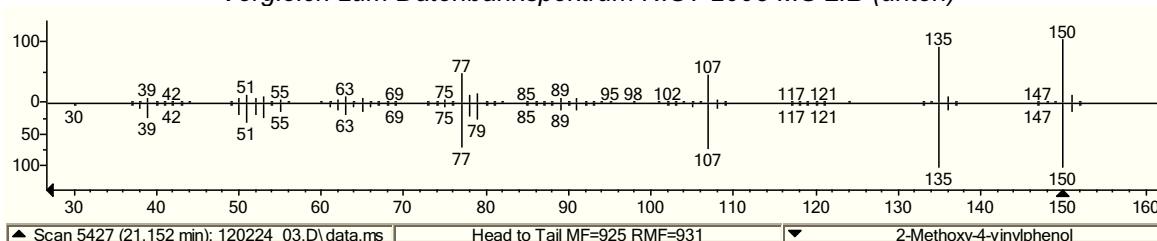


Abbildung 7.146: Massenspektrum des authentischen Standards 4-Vinylguaiacol (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

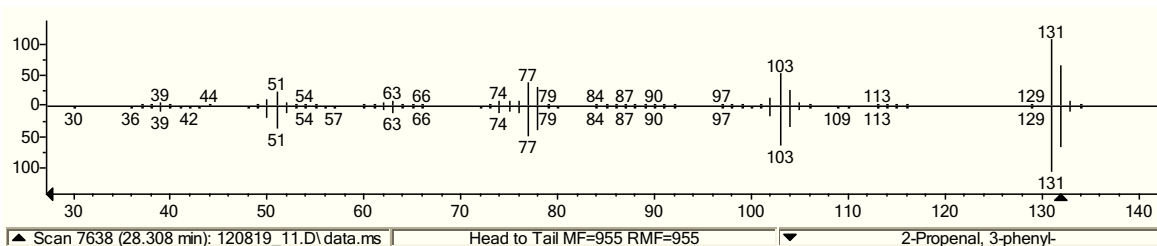


Abbildung 7.147: Massenspektrum des authentischen Standards Zimtaldehyd (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

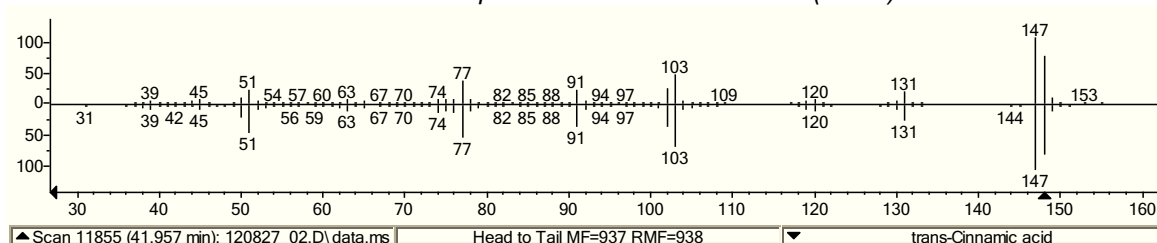


Abbildung 7.148: Massenspektrum des authentischen Standards (E)-Zimtsäure (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

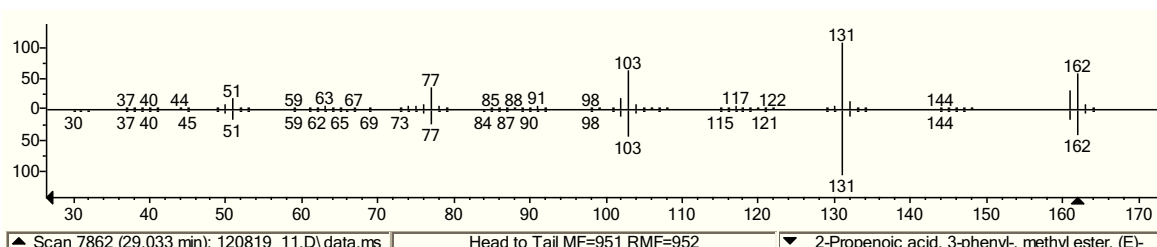


Abbildung 7.149: Massenspektrum des authentischen Standards Zimtsäuremethylester (oben) im Vergleich zum Datenbankspektrum NIST 2008 MS LIB (unten)

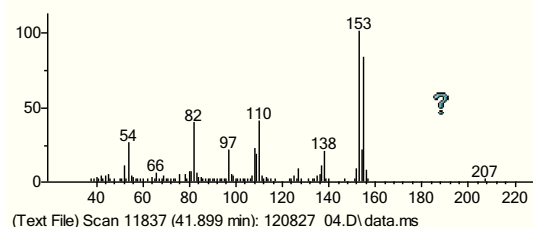


Abbildung 7.150: Massenspektrum des authentischen Standards (E)-D<sub>7</sub>-Zimtsäure

Tabelle 7.94: Zur Quantifizierung eingesetzte response factor (Rf)

Substanz	response factor Rf
1H-Pyrrol-2-carboxaldehyd	1,99
2-Methylbuttersäure	2,38
2-Methylpropan-1-ol	3,68
2-Phenylethanol	1,32
3-Phenylpropanal	1,52
3-Phenylpropanol	1,18
4-Hydroxy-4-methylpentan-2-on	5,28
Benzaldehyd	0,72
Benzylalkohol	0,72

Substanz	response factor Rf
Essigsäure	6,52
Geraniol	1,39
Linalool	1,34
Nonan-2-ol	2,22
Oct-1-en-3-ol	0,85
Phenyllessigsäure	1,85
Phenyllessigsäuremethylester	1,14

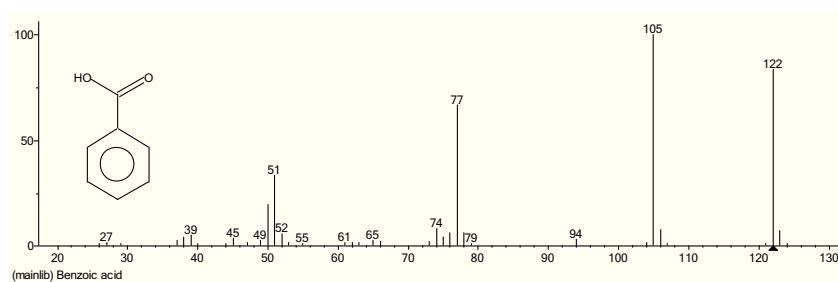


Abbildung 7.151: Massenspektrum von Benzoesäure der Datenbank NIST 2008 MS LIB

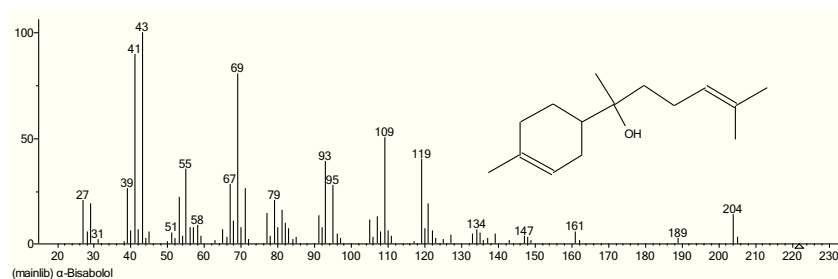
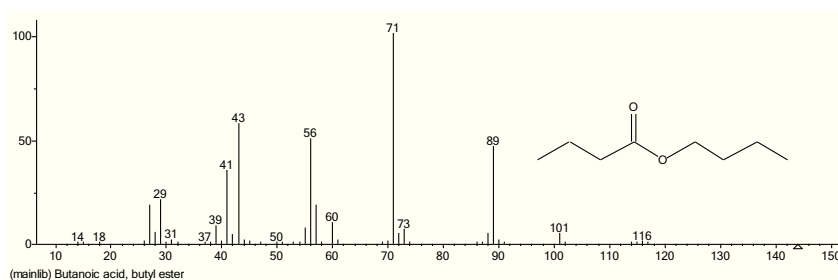
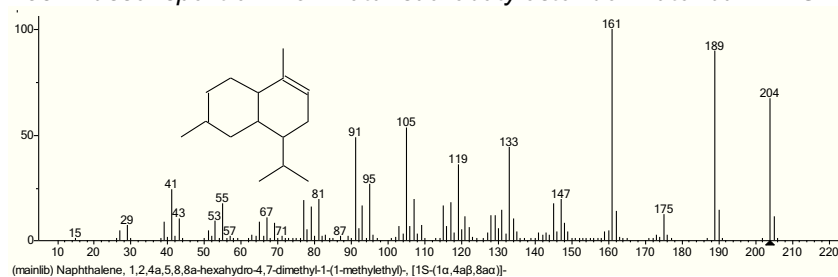
Abbildung 7.152: Massenspektrum von  $\alpha$ -Bisabolol der Datenbank NIST 2008 MS LIB

Abbildung 7.153: Massenspektrum von Butansäurebutylester der Datenbank NIST 2008 MS LIB

Abbildung 7.154: Massenspektrum von  $\beta$ -Cadinen der Datenbank NIST 2008 MS LIB

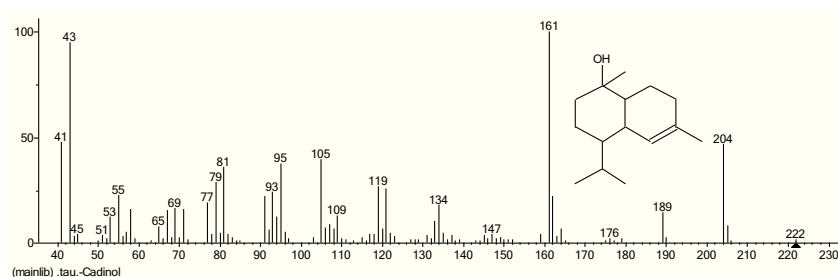


Abbildung 7.155: Massenspektrum von  $\tau$ -Cadinol der Datenbank NIST 2008 MS LIB

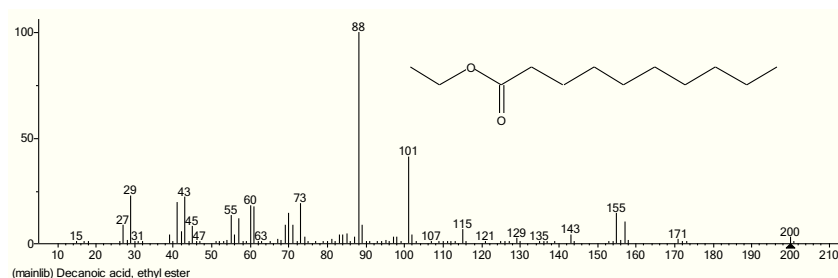


Abbildung 7.156: Massenspektrum von Caprinsäureethylester der Datenbank NIST 2008 MS LIB

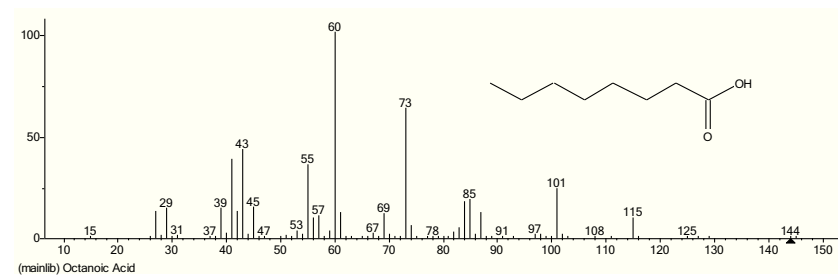


Abbildung 7.157: Massenspektrum von Caprylsäure der Datenbank NIST 2008 MS LIB

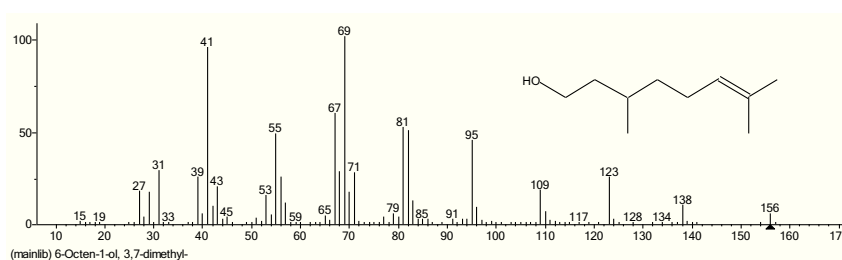


Abbildung 7.158: Massenspektrum von Citronellol der Datenbank NIST 2008 MS LIB

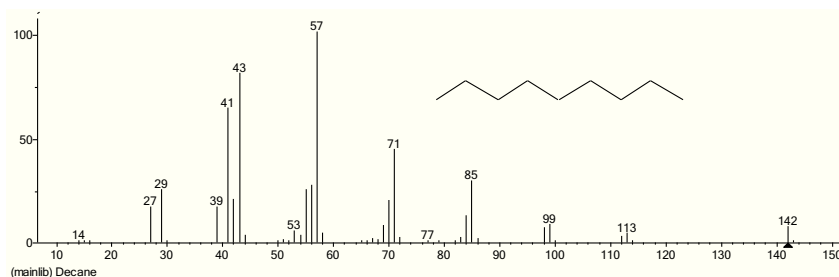


Abbildung 7.159: Massenspektrum von Decan der Datenbank NIST 2008 MS LIB

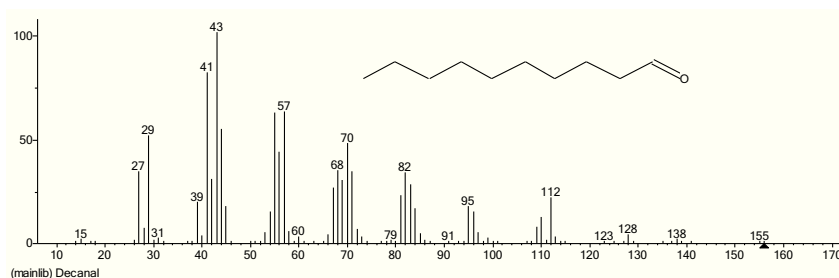


Abbildung 7.160: Massenspektrum von Decanal der Datenbank NIST 2008 MS LIB

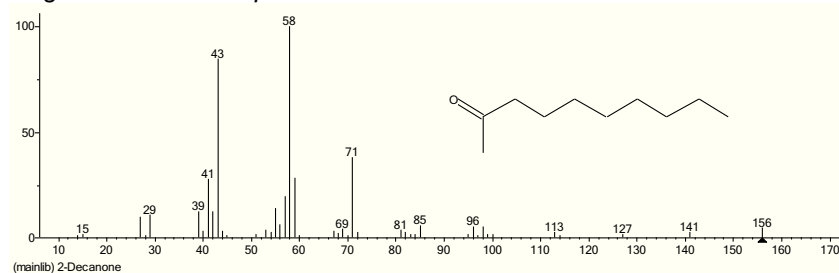


Abbildung 7.161: Massenspektrum von Decan-2-on der Datenbank NIST 2008 MS LIB

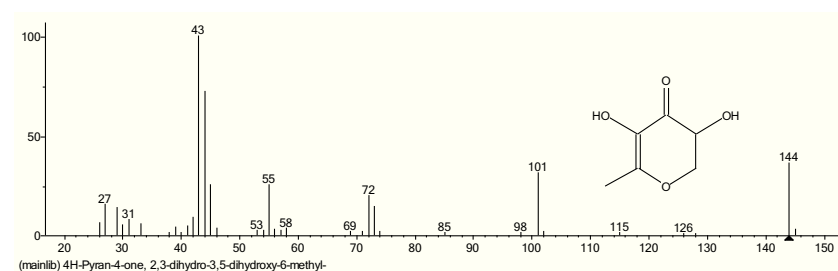


Abbildung 7.162: Massenspektrum von 2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-on der Datenbank NIST 2008 MS LIB

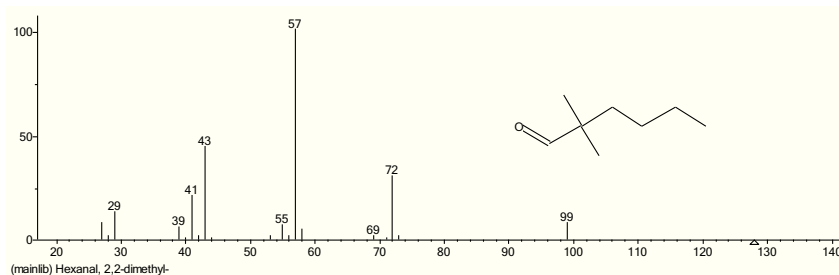


Abbildung 7.163: Massenspektrum von 2,2-Dimethylhexanal der Datenbank NIST 2008 MS LIB

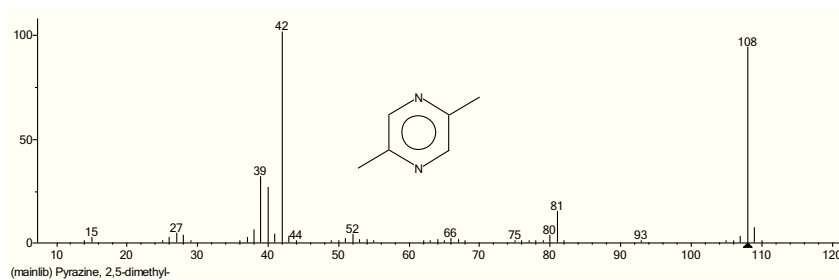


Abbildung 7.164: Massenspektrum von 2,5-Dimethylpyrazin der Datenbank NIST 2008 MS LIB

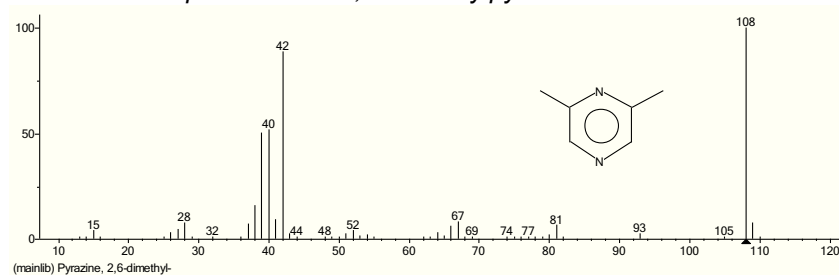


Abbildung 7.165: Massenspektrum von 2,6-Dimethylpyrazin der Datenbank NIST 2008 MS LIB

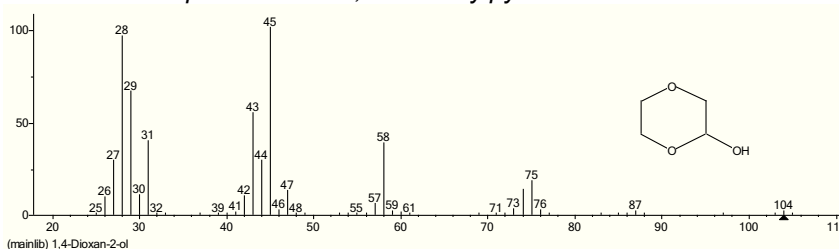


Abbildung 7.166: Massenspektrum von 1,4-Dioxan-2-ol der Datenbank NIST 2008 MS LIB

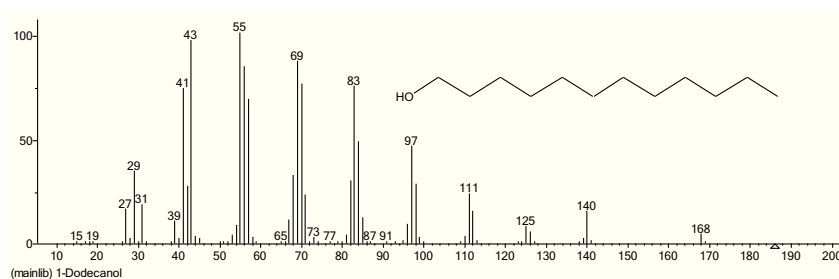


Abbildung 7.167: Massenspektrum von Dodecan-1-ol der Datenbank NIST 2008 MS LIB

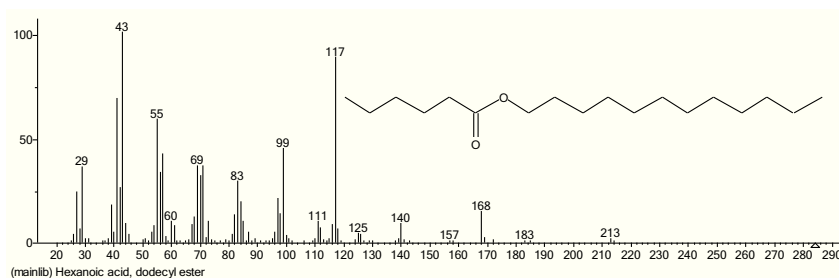


Abbildung 7.168: Massenspektrum von Dodecylhexanoat der Datenbank NIST 2008 MS LIB



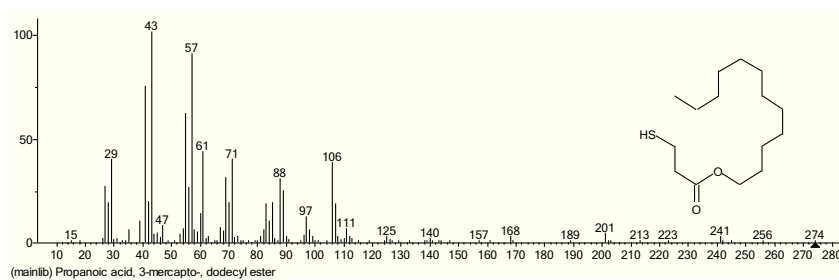


Abbildung 7.169: Massenspektrum von Dodecyl-3-mercaptopropionat der Datenbank NIST 2008

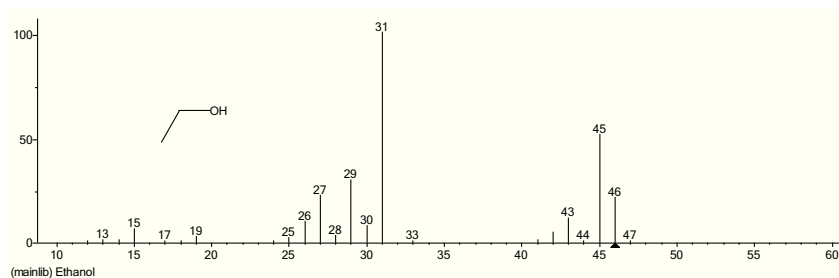


Abbildung 7.170: Massenspektrum von Ethanol der Datenbank NIST 2008 MS LIB

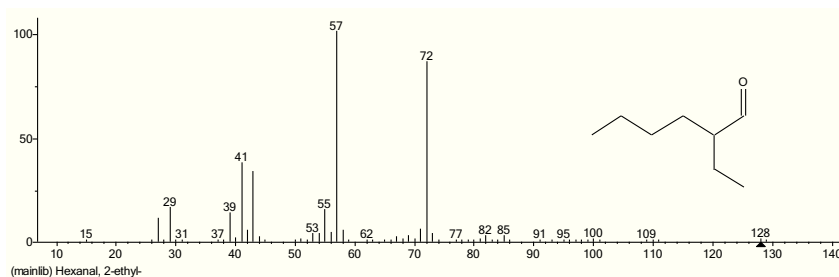


Abbildung 7.171: Massenspektrum von 2-Ethylhexanal der Datenbank NIST 2008 MS LIB

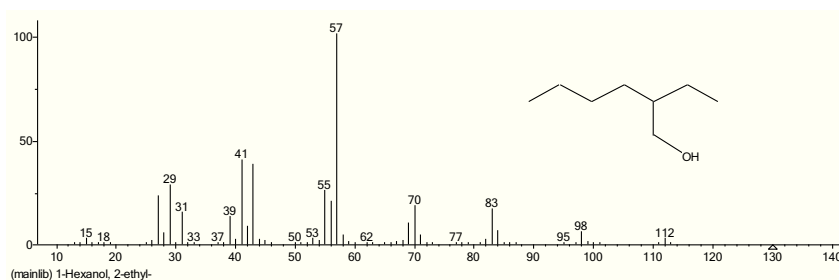


Abbildung 7.172: Massenspektrum von 2-Ethylhexanol der Datenbank NIST 2008 MS LIB

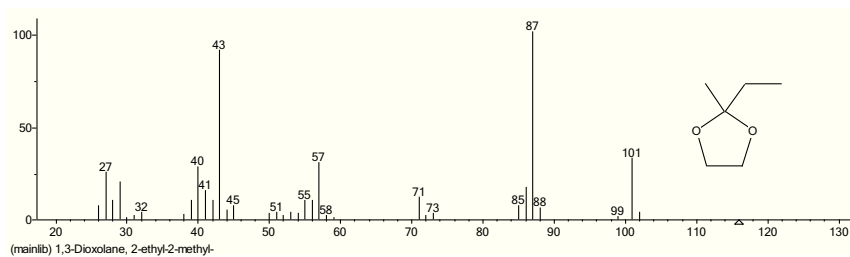


Abbildung 7.173: Massenspektrum von 2-Ethyl-2-methyl-1,3-dioxolan der Datenbank NIST 2008 MS LIB

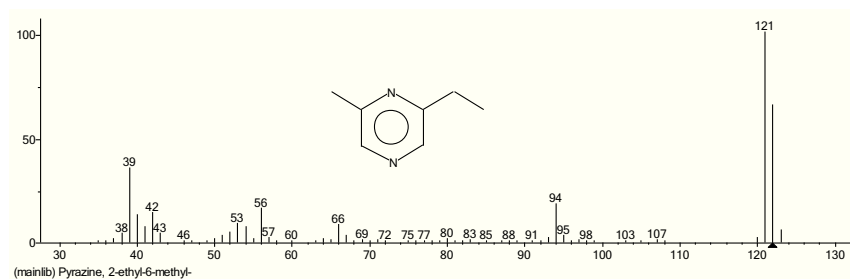


Abbildung 7.174: Massenspektrum von 2-Ethyl-6-methylpyrazin der Datenbank NIST 2008 MS LIB

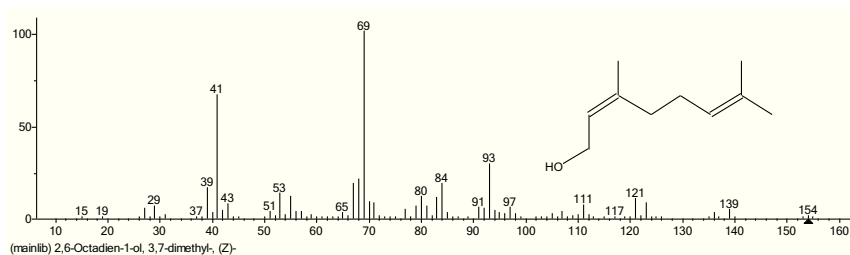


Abbildung 7.175: Massenspektrum von (Z)-Geraniol der Datenbank NIST 2008 MS LIB

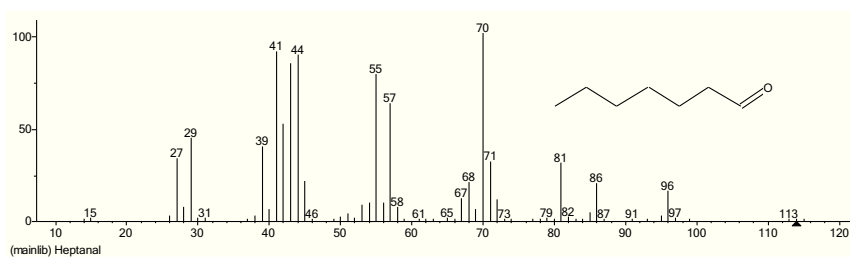


Abbildung 7.176: Massenspektrum von Heptanal der Datenbank NIST 2008 MS LIB

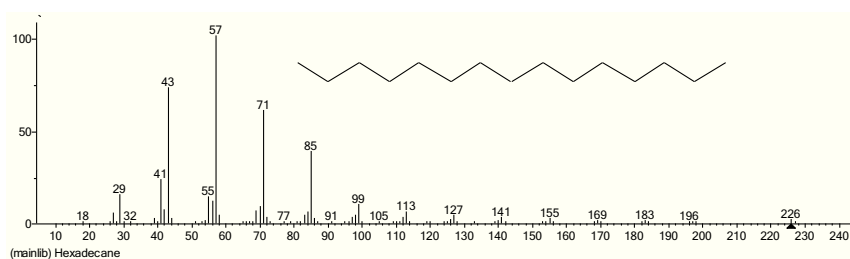


Abbildung 7.177: Massenspektrum von Hexadecan der Datenbank NIST 2008 MS LIB

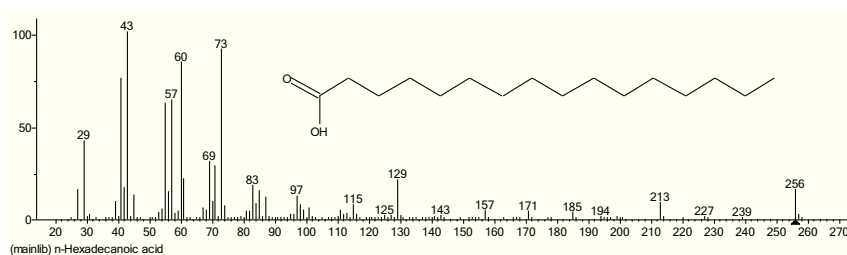


Abbildung 7.178: Massenspektrum von n-Hexadecansäure der Datenbank NIST 2008 MS LIB

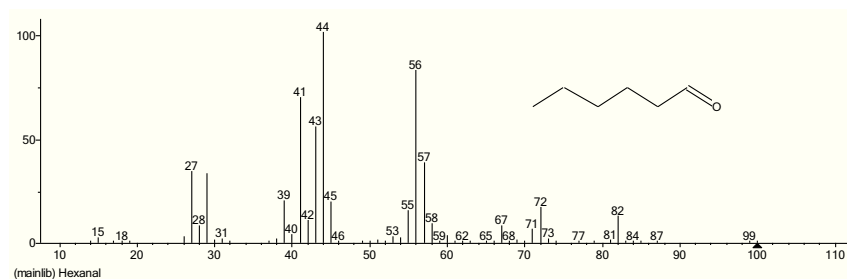


Abbildung 7.179: Massenspektrum von Hexanal der Datenbank NIST 2008 MS LIB

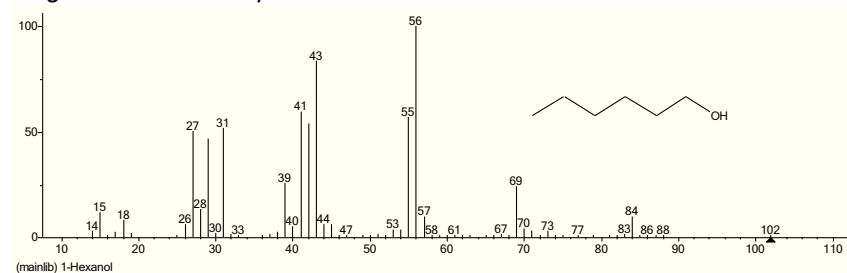


Abbildung 7.180: Massenspektrum von Hexan-1-ol der Datenbank NIST 2008 MS LIB

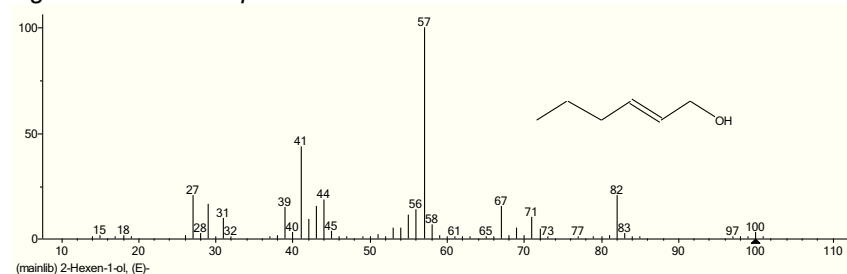


Abbildung 7.181: Massenspektrum von 2-Hexen-1-ol der Datenbank NIST 2008 MS LIB

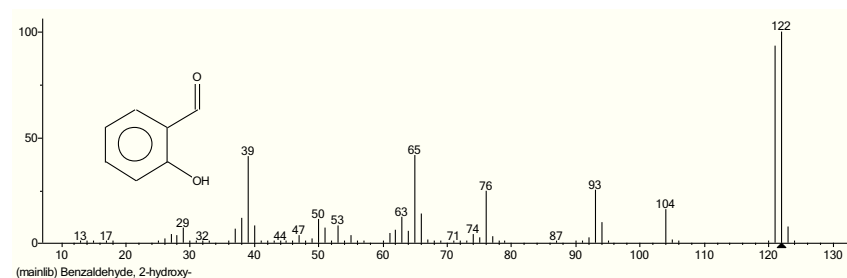


Abbildung 7.182: Massenspektrum von 2-Hydroxybenzaldehyd der Datenbank NIST 2008 MS LIB

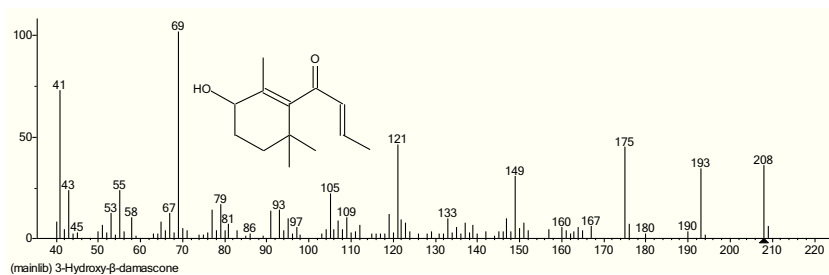


Abbildung 7.183: Massenspektrum von 3-Hydroxy- $\beta$ -damascon der Datenbank NIST 2008 MS LIB

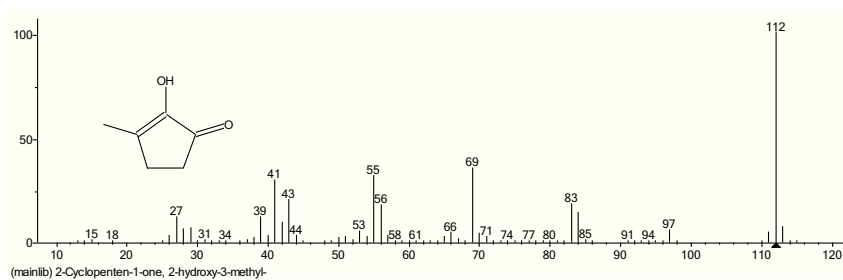


Abbildung 7.184: Massenspektrum von 2-Hydroxy-3-methyl-2-cyclopenten-1-on der Datenbank NIST 2008 MS LIB

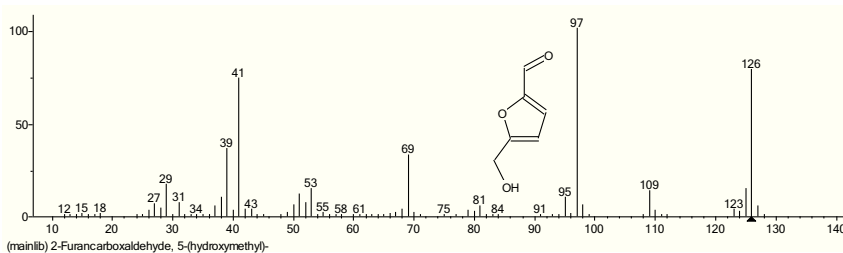


Abbildung 7.185: Massenspektrum von 5-Hydroxymethylfurfural der Datenbank NIST 2008 MS LIB

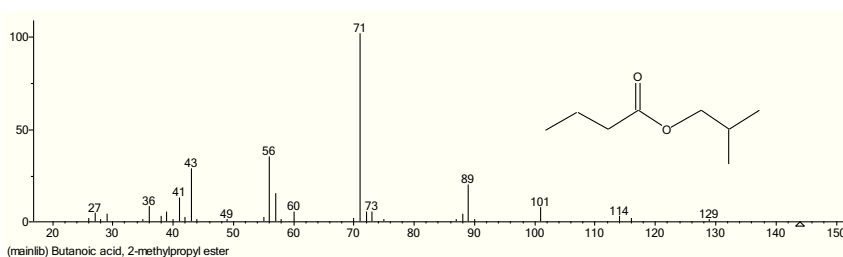


Abbildung 7.186: Massenspektrum von Isobutylbutyrat der Datenbank NIST 2008 MS LIB

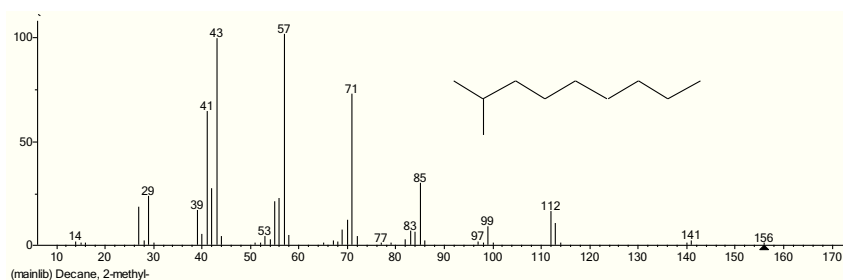


Abbildung 7.187: Massenspektrum von 2-Methyldecan der Datenbank NIST 2008 MS LIB

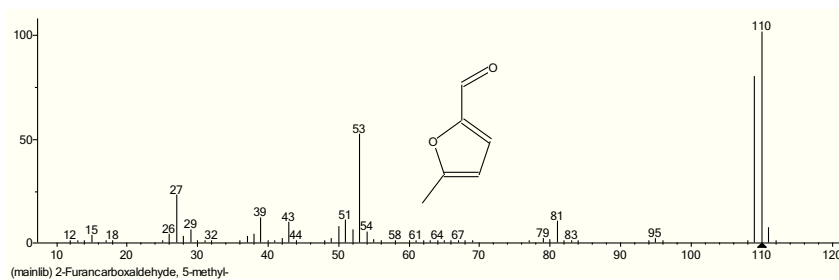


Abbildung 7.188: Massenspektrum von 5-Methyl-2-furaldehyd der Datenbank NIST 2008 MS LIB

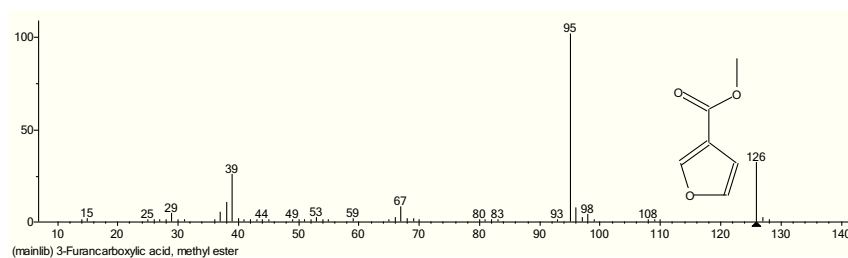


Abbildung 7.189: Massenspektrum von Methylfuran-3-carboxylat der Datenbank NIST 2008 MS LIB

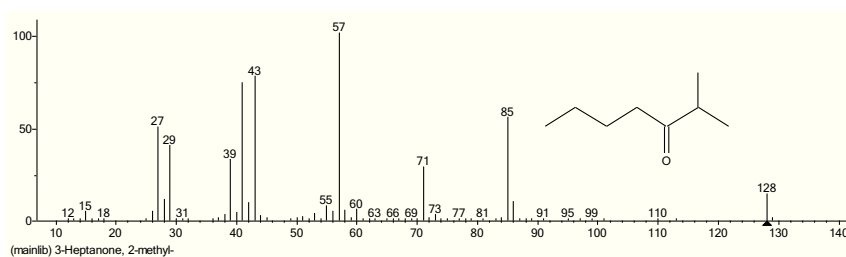


Abbildung 7.190: Massenspektrum von 2-Methylheptan-3-on der Datenbank NIST 2008 MS LIB

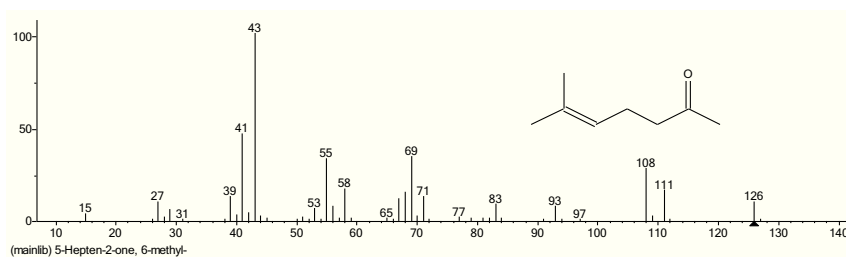


Abbildung 7.191: Massenspektrum von 6-Methyl-5-hepten-2-on der Datenbank NIST 2008 MS LIB

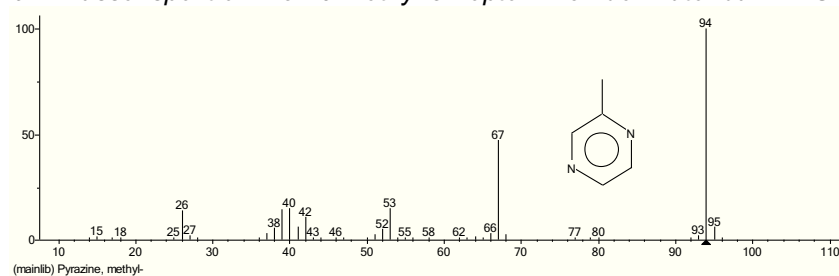


Abbildung 7.192: Massenspektrum von Methylpyrazin der Datenbank NIST 2008 MS LIB

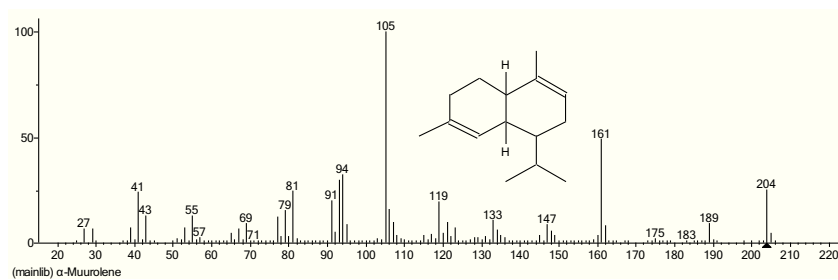


Abbildung 7.193: Massenspektrum von α-Muurolen der Datenbank NIST 2008 MS LIB

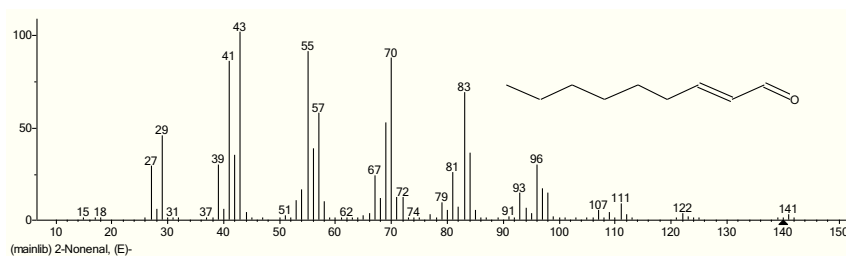


Abbildung 7.194: Massenspektrum von 2-Nonenal der Datenbank NIST 2008 MS LIB

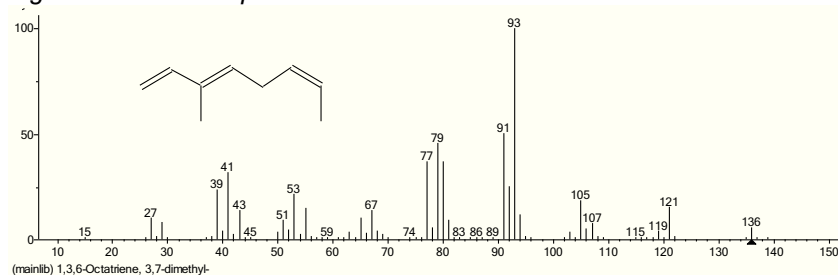


Abbildung 7.195: Massenspektrum von β-Ocimen der Datenbank NIST 2008 MS LIB

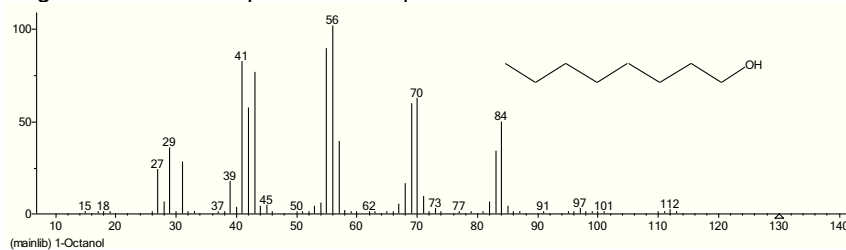


Abbildung 7.196: Massenspektrum von Octan-1-ol der Datenbank NIST 2008 MS LIB

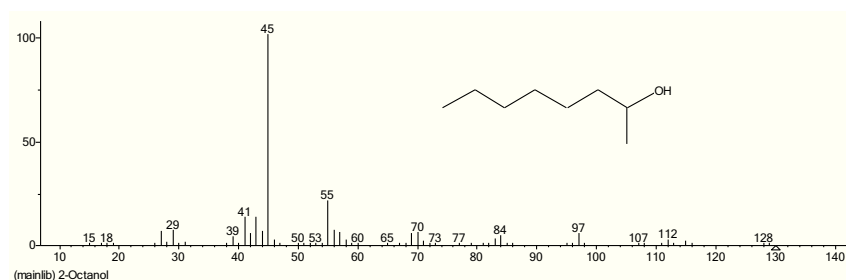


Abbildung 7.197: Massenspektrum von Octan-2-ol der Datenbank NIST 2008 MS LIB

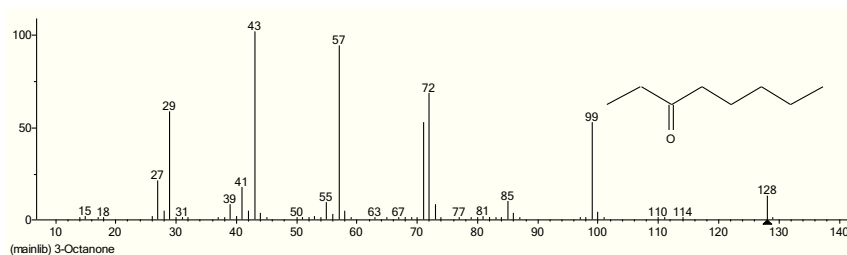


Abbildung 7.198: Massenspektrum von Octan-3-on der Datenbank NIST 2008 MS LIB

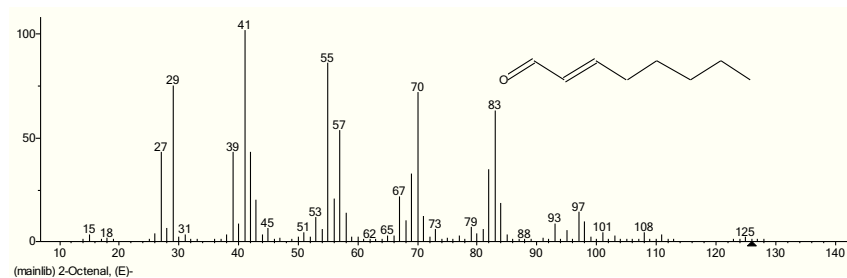


Abbildung 7.199: Massenspektrum von 2-Octenal der Datenbank NIST 2008 MS LIB

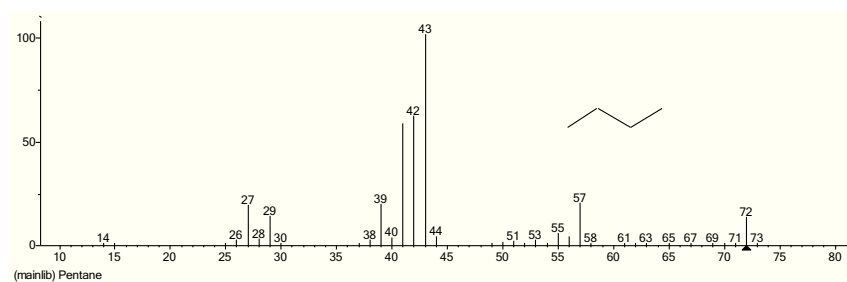


Abbildung 7.200: Massenspektrum von Pentan der Datenbank NIST 2008 MS LIB

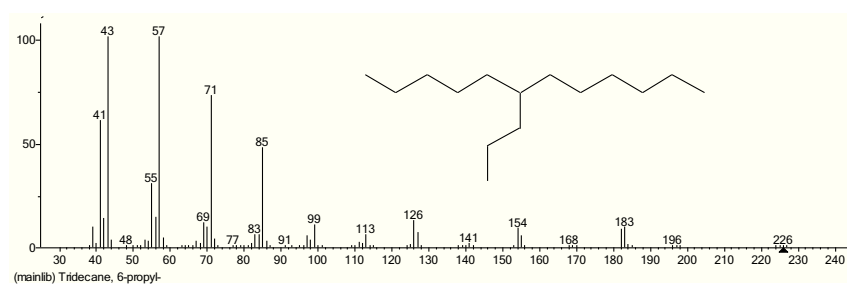


Abbildung 7.201: Massenspektrum von 6-Propyltridecan der Datenbank NIST 2008 MS LIB MS LIB

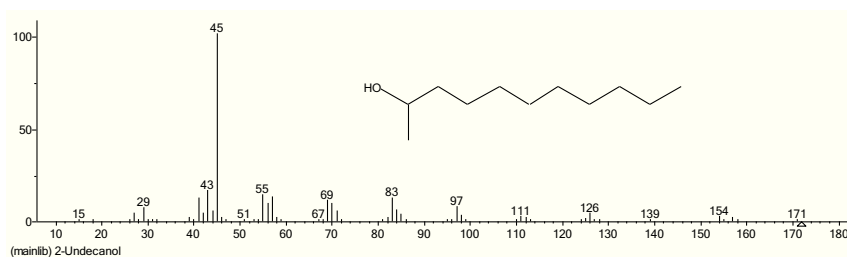


Abbildung 7.202: Massenspektrum von Undecan-2-ol der Datenbank NIST 2008 MS LIB

